



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112013009817-1 B1**



**(22) Data do Depósito: 26/10/2011**

**(45) Data de Concessão: 04/02/2020**

---

**(54) Título:** MÉTODOS DE DEGRADAR OU CONVERTER REFUGO DE CANA DE AÇÚCAR, DE PRODUZIR UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, DE FERMENTAR REFUGO DE CANA DE AÇÚCAR

**(51) Int.Cl.:** C12P 7/10; C12P 19/14.

**(30) Prioridade Unionista:** 26/10/2010 US 61/406,929.

**(73) Titular(es):** NOVOZYMES A/S; NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC..

**(72) Inventor(es):** BENJAMIN KNUDSEN; ARMINDO RIBEIRO.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2011057863 de 26/10/2011

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/058293 de 03/05/2012

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 22/04/2013

**(57) Resumo:** MÉTODOS DE DEGRADAR OU CONVERTER REFUGO DE CANA DE AÇÚCAR, DE PRODUZIR UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, DE FERMENTAR REFUGO DE CANA DE AÇÚCAR. A presente invenção diz respeito a métodos de sacrificar a fração de refugo (folha) de cana de açúcar usando enzimas.

“MÉTODOS DE DEGRADAR OU CONVERTER REFUGO DE CANA DE AÇÚCAR, DE PRODUZIR UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, DE FERMENTAR REFUGO DE CANA DE AÇÚCAR”

### **Referência Cruzada ao Pedido Relacionado**

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Serial No. 61/406.929, depositado em 26 de outubro de 2010.

### **Referência a uma Listagem de Sequência**

[002] Este pedido contém uma listagem de sequência na forma legível por computador. A forma legível por computador é aqui incorporada por referência.

### **Fundamentos da Invenção**

#### **Campo da invenção**

[003] A presente invenção diz respeito a métodos de degradar ou converter a fração de refugo da cana de açúcar.

#### **Descrição da Técnica Relacionada**

[004] A cana de açúcar é composta de duas partes: caule e folhas e galhos. O caule é volumoso, nodoso, fibroso e rico em açúcares, particularmente sacarose e é a porção normalmente associados com a cana de açúcar (cana limpa), isto é, a parte da planta de cana entre o nível da plantação e o nó final do caule superior. O refugo da cana de açúcar é dividido em três componentes principais: folhas verdes, folhas secas e topos (Neto, 2005, Characterization of sugarcane trash and bagasse, In: Hassuani, S.J.; Leal, M.L.R.V.; Macedo, I.C. *Biomass Power Geration. Sugarcane Bagasse and Trash*, Publicado por PNUD e CTC, 1ª edição, Piracicaba, Brasil, p. 24). As folhas verdes são folhas verdes e amarelas, os topos são a parte da planta de cana entre a extremidade de topo e o último nó do caule e folhas secas são folhas que já secaram e são normalmente amarronzadas na cor.

[005] O acúmulo de sacarose é maior na base do caule e a

quantidade de açúcares redutores e celulose é superior nos topos (Triana *et al.*, 1990, *Atlas of sugarcane bagasse*, Publicado por Geplacea and Icidca, México, p. 139). O comprimento do caule varia e depende da variedade da planta e do controle da cultura fornecido. Um caule adulto pode ser menor do que dois metros até mais do que seis metros no comprimento, que afeta o número e comprimento dos internos. O diâmetro do caule também varia, oscilando na sua parte intermediária de 250 a 350 mm. A cor depende do teor de clorofila, teor de antocianina e aspectos de agronomia (Triana *et al.*, 1990, *supra*).

[006] Os caules são moídos para se obter um caldo de suco de cana, que é subsequentemente usado para a produção de sacarose ou etanol. A fração residual do caule depois do processamento é conhecida como bagaço. Além do bagaço, o refugo da cana de açúcar é um outro resíduo da produção de açúcar e etanol. A quantidade de folhas e galhos da colheita da cana de açúcar depende de vários fatores tais como sistema de colheita (cana queimada ou não queimada), coroamento, altura, variedade da cana, idade da safra (estágio de corte), clima e solo.

[007] O bagaço e folhas e galhos são materiais lignocelulósicos e são compostos de celulose, hemiceluloses e lignina. A celulose e hemicelulose compõem a fração de carboidrato do material.

[008] A celulose é um homopolissacarídeo composto de unidades de D-glicose unidas entre si pelas ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto de unidades de D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, ácido D-glicurônico e ácido 4-O-metil-D-glicurônico. A lignina é uma macromolécula aromática complexa formada pela polimerização de radical de três alcoóis fenil-propano, a saber, o álcool *p*-coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Na parede da célula vegetal, a lignina e hemiceluloses envolvem as fibrilas elementares da celulose, fornecendo proteção contra a degradação química

e/ou biológica (Kuhad *et al.*, 1997, Microorganisms and their enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls, *Advances Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 57, pp. 45-125).

[009] Quantitativamente, a celulose, hemiceluloses e lignina estão presentes no bagaço em uma proporção de 42 a 55,7 %, 20 a 28,8 % e 22,2 a 31,4 %, respectivamente. Os componentes não estruturais da biomassa, a saber, extrativos (2 a 10 %) e cinza (1 a 2,4 %) são as outras substâncias que são partes da composição química do bagaço da cana de açúcar.

[0010] As folhas e galhos são compostos aproximadamente de 36,1 a 45 % de celulose, 25 a 32,65 % de hemicelulose, 18 a 26,2 % de lignina, 5,3 a 7,0 % de extrativos e de 2,1 a 3,4 % de cinza (Saad *et al.*, 2008, Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 43, pp. 220-225; Singh *et al.*, 2008, Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, pp. 667-673).

[0011] O bagaço é um de muitos substratos lignocelulósicos sob estudo para a produção de etanol de segunda geração. Por outro lado, o refugo da cana de açúcar foi ignorado como um substrato de lignocelulose para a produção de etanol de segunda geração.

[0012] Seria uma vantagem na técnica ser capaz de usar refugo da cana de açúcar como uma fonte de lignocelulose para a produção de etanol.

[0013] A presente invenção diz respeito a métodos de degradar ou converter refugo da cana de açúcar.

### **Sumário da Invenção**

[0014] A presente invenção diz respeito a métodos de degradar ou converter refugo da cana de açúcar, que compreende: separar o refugo da cana de açúcar da cana de açúcar e sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima.

[0015] A presente invenção também diz respeito a métodos de produzir um produto de fermentação, que compreende:

(a) colher e separar o refugo da cana de açúcar da cana de açúcar;

(b) pré-tratar o refugo da cana de açúcar;

(c) sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima;

(d) fermentar o refugo da cana de açúcar sacarificado com um ou mais (por exemplo, vários) microrganismos de fermentação para produzir o produto de fermentação; e

(e) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[0016] A presente invenção também diz respeito a métodos de produzir um produto de fermentação, que compreende:

(a) sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima;

(b) fermentar o refugo da cana de açúcar sacarificado com um ou mais (por exemplo, vários) microrganismos de fermentação para produzir o produto de fermentação; e

(c) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[0017] A presente invenção também diz respeito a métodos de fermentar o refugo da cana de açúcar, que compreende: fermentar o refugo da cana de açúcar com um ou mais (por exemplo, vários) microrganismos de fermentação, em que o refugo da cana de açúcar é sacarificado com uma composição de enzima.

[0018] Em um aspecto, a composição de enzima compreende uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma celulase, um polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, uma hemicelulase, uma esterase, uma expansina, uma lacase, uma enzima ligninolítica, uma pectinase, uma peroxidase, uma protease e uma

suolenina.

### **Breve Descrição das Figuras**

[0019] A Figura 1 mostra os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados a 22 % de sólidos totais (TS) com 1,0 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 175°C por 5 minutos. A hidrólise enzimática foi realizada em uma escala de pasta fluida de 20 g a 11 % de TS, pH 5,0 e 50°C com uma composição de enzima composta de Cellic® CTec2 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) nas dosagens de 0,02, 0,04 e 0,06 g por grama de celulose por 120 horas.

[0020] A Figura 2 mostra os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados a 22 % de TS com 0,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 175°C por 5 minutos. A hidrólise enzimática foi realizada em uma escala de pasta fluida de 20 g a 11 % de TS, pH 5,0 e 50°C com uma composição de enzima composta de Cellic® CTec2 nas dosagens de 0,02, 0,04 e 0,06 g por grama de celulose por 120 horas.

[0021] A Figura 3 mostra os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados a 12 % de TS com 6 % de NaOH a 120°C por 120 minutos. A hidrólise enzimática foi realizada em uma escala de pasta fluida de 20 g a 11 % de TS, pH 5,0 e 50°C com uma composição de enzima composta de Cellic® CTec2 nas dosagens de 0,02, 0,04 e 0,06 g por grama de celulose por 120 horas.

[0022] A Figura 4 mostra os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados a 20 % de TS por 8 minutos a 205°C. A hidrólise enzimática foi realizada em uma escala de pasta fluida de 20 g a 5 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,03 g por grama de celulose por 144 horas.

[0023] A Figura 5 mostra os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados a 205°C por 8 minutos. A hidrólise enzimática foi realizada em uma escala de pasta fluida de 20 g a 5 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,04 g por grama de celulose por 144 horas.

[0024] A Figura 6 mostra os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados com 0,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contra sólidos, a 205°C por 8 minutos. A hidrólise enzimática foi realizada em uma escala de pasta fluida de 20 g a 5 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,04 g por grama de celulose por 144 horas.

[0025] A Figura 7 mostra os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados com 2,5 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> contra sólidos, a 190°C por 20 minutos. A hidrólise enzimática foi realizada em uma escala de pasta fluida de 20 g a 8 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,07 g por grama de celulose por 168 horas.

### Definições

[0026] **Acetilxilano esterase:** O termo “acetilxilano esterase” significa uma carboxilesterase (EC 3,1,1,72) que catalisa a hidrólise de grupos acetila de xilano polimérico, xilose acetilada, glicose acetilada, acetato de alfa-naftila, e acetato de p-nitrofenila. Para os propósitos da presente invenção, a atividade de acetilxilano esterase é determinada usando 0,5 mM de acetato de p-nitrofenila como substrato em 50 mM de acetato de sódio pH 5,0 contendo 0,01 % de TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietileno sorbitano). Uma unidade de acetilxilano esterase é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ânion p-nitrofenolato por minuto no pH 5, 25°C.

[0027] **Alfa-L-arabinofuranosidase:** O termo “alfa-L-arabino-

“furanosidase” significa uma alfa-L-arabinofuranosídeo arabinofuranohidrolase (EC 3,2,1,55) que catalisa a hidrólise de resíduos de alfa-L-arabinofuranosídeo não redutores terminais em alfa-L-arabinosídeos. A enzima atua sobre alfa-L-arabinofuranosídeos, alfa-L-arabinanas contendo ligações (1,3) e/ou (1,5), arabinoxilanos, e arabinogalactanas. A alfa-L-arabinofuranosidase também é conhecida como arabinosidase, alfa-arabinosidase, alfa-L-arabinosidase, alfa-arabinofuranosidase, polissacarídeo alfa-L-arabinofuranosidase, alfa-L-arabinofuranosídeo hidrolase, L-arabinosidase, ou alfa-L-arabinanase. Para os propósitos da presente invenção, a atividade de alfa-L-arabinofuranosidase é determinada usando 5 mg de arabinoxilano do trigo de viscosidade média (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irlanda) por ml de acetato de sódio a 100 mM pH 5 em um volume total de 200 µl por 30 minutos a 40°C seguido pela análise de arabinose pela cromatografia em coluna AMINAX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

[0028] **Alfa-glicuronidase:** O termo “alfa-glicuronidase” significa uma alfa-D-glicosiduronato glicuronoidrolase (EC 3,2,1,139) que catalisa a hidrólise de um alfa-D-glicuronosídeo para D-glicuronato e um álcool. Para os propósitos da presente invenção, a atividade de alfa-glicuronidase é determinada de acordo com de Vries, 1998, J. Bacteriol. 180: 243-249. Uma unidade de alfa-glicuronidase é igual à quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido glicurônico ou 4-O-metilglicurônico por minuto no pH 5, 40°C.

[0029] **Beta-glicosidade:** O termo “beta-glicosidade” significa uma beta-D-glicosídeo glicoidrolase (E.C. 3,2,1,21), que catalisa a hidrólise de resíduos de beta-D-glicose não redutores terminais com a liberação de beta-D-glicose. Para os propósitos da presente invenção, a atividade de beta-glicosidade é determinada usando p-nitrofenil-beta-D-glicopiranosídeo como substrato de acordo com o procedimento de Venturi *et al.*, 2002, Extracellular

beta-D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties, J. Basic Microbiol. 42: 55-66. Uma unidade de beta-glicosidade é definida como 1,0 µmol de ânion p-nitrofenolato produzido por minuto a 25°C, pH 4,8 de 1 mM de p-nitrofenil-beta-D-glicopiranosídeo como substrato em 50 mM de citrato de sódio contendo 0,01 % de TWEEN® 20.

[0030]       **Beta-xilosidase:** O termo “beta-xilosidase” significa uma beta-D-xiloside xiloidrolase (E.C. 3,2,1,37) que catalisa a exo-hidrólise de beta (1→4)-xilooligossacarídeos curtos, para remover resíduos de D-xilose sucessivos de terminais não redutores. Para os propósitos da presente invenção, uma unidade de beta-xilosidase é definida como 1,0 µmol do ânion de p-nitrofenolato produzido por minuto a 40°C, pH 5 a partir de 1 mM de p-nitrofenil-beta-D-xilosídeo como substrato em 100 mM de citrato de sódio contendo 0,01 % de TWEEN® 20.

[0031]       **cDNA:** O termo “cDNA” significa uma molécula de DNA que pode ser preparada pela transcrição reversa de uma molécula de mRNA madura, unida, obtida de uma célula eucariótica ou procariótica. O cDNA carece de sequências de intron que podem estar presentes no DNA genômico correspondente. O transcrito de RNA inicial, primário é um precursor para o mRNA que é processado através de uma série de etapas, incluindo a junção, antes de aparecer como mRNA unido maduro.

[0032]       **Celobiohidrolase:** O termo “celobiohidrolase” significa uma 1,4-beta-D-glicano celobiohidrolase (E.C. 3,2,1,91), que catalisa a hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose, celooligossacarídeos, ou qualquer polímero contendo glicose ligado em 1,4-beta, que libera celobiose das extremidades redutoras e não redutoras da cadeia (Teeri, 1997, Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology 15: 160-167; Teeri *et al.*, 1998, Trichoderma reesei cellobiohidrolases: why so efficient on crystalline cellulose?, Biochem. Soc.

Trans. 26: 173-178). A atividade de celobioidrolase é determinada de acordo com os procedimentos descritos por Lever *et al.*, 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh *et al.*, 1982, FEBS Letters, 149: 152-156; van Tilbeurgh e Claeysens, 1985, FEBS Letters, 187: 283-288; e Tomme *et al.*, 1988, Eur. J. Biochem. 170: 575-581. Na presente invenção, o método de Tomme *et al.* pode ser utilizado para determinar a atividade de celobioidrolase.

[0033] **Enzima celulolítica ou celulase:** O termo “enzima celulolítica” ou “celulase” significa uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas que hidrolisam um material celulósico. Tais enzimas incluem endoglicanase(s), celobioidrolase(s), beta-glicosidade(s), ou combinações destas. Os dois métodos básicos para medir a atividade celulolítica incluem: (1) medir a atividade celulolítica total, e (2) medir as atividades celulolíticas individuais (endoglicanases, celobioidrolases, e beta-glicosidades) como revisado em Zhang *et al.*, Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481. A atividade celulolítica total é usualmente medida usando substratos insolúveis, incluindo papel de filtro Whatman Nº 1, celulose microcristalina, celulose bacteriana, celulose algal, algodão, lignocelulose pré-tratada, etc. O ensaio da atividade celulolítica total mais comum é o ensaio do papel de filtro usando papel de filtro Whatman Nº 1 como o substrato. O ensaio foi estabelecido pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

[0034] Para os propósitos da presente invenção, a atividade da enzima celulolítica é determinada medindo-se o aumento na hidrólise de um material celulósico pela(s) enzima(s) celulolítica(s) sob as seguintes condições: 1 a 50 mg de proteína de enzima celulolítica/g de celulose em PCS (ou outro material celulósico pré-tratado) por 3 a 7 dias em uma temperatura adequada, por exemplo, 50°C, 55°C ou 60°C, comparada a uma hidrólise de controle

sem a adição de proteína de enzima celulolítica. As condições típicas são reações de 1 ml, PCS lavada ou não lavada, 5 % de sólidos insolúveis, 50 mM de acetato de sódio pH 5, 1 mM de MnSO<sub>4</sub>, 50°C, 55°C ou 60°C, 72 horas, análise de açúcar pela coluna AMINAX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

[0035] **Material celulósico:** O termo “material celulósico” significa qualquer material contendo celulose. O polissacarídeo predominante na parede de célula primária da biomassa é a celulose, o segundo mais abundante é a hemicelulose, e o terceiro é a pectina. A parede celular secundária, produzida depois que a célula parou de crescer, também contém polissacarídeos e é reforçada pela lignina polimérica covalentemente reticulada à hemicelulose. A celulose é um homopolímero de anidrocetobiose e assim um beta-(1-4)-D-glicano linear, enquanto que as hemiceluloses incluem uma variedade de compostos, tais como xilanos, xiloglicanos, arabinoxilanos, e mananas em estruturas ramificadas complexas com um espectro de substituintes. Embora no geral polimorfa, a celulose é encontrada no tecido vegetal primariamente como uma matriz cristalina insolúvel de cadeias de glicano paralelas. As hemiceluloses usualmente ligam hidrogênio à celulose, assim como às outras hemiceluloses, o que ajuda a estabilizar a matriz da parede celular.

[0036] A celulose é no geral encontrada, por exemplo, nas hastes, folhas, palhas, cascas, e sabugos de plantas ou folhas, ramos, e madeira de árvores. O material celulósico pode ser, mas não é limitado a, resíduo agrícola, material herbáceo (incluindo safras de energia), resíduos sólidos municipais, polpa e resíduo de moinho de papel, papel e madeira residuais (incluindo resíduos florestais (ver, por exemplo, Wiselogel *et al.*, 1995, em Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp. 105-118, Taylor & Francis, Washington D. C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719;

Mosier *et al.*, 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, em *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, T. Scheper, editor geral, Volume 65, pp. 23-40, Springer-Verlag, Nova Iorque). É aqui entendido que a celulose pode estar na forma de lignocelulose, um material da parede da célula vegetal contendo lignina, celulose, e hemicelulose em uma matriz mista. Em um aspecto preferido, o material celulósico é qualquer material de biomassa. Em um outro aspecto preferido, o material celulósico é lignocelulose, que compreende celulose, hemiceluloses e lignina.

[0037] Em um aspecto, o material celulósico é resíduo agrícola. Em um outro aspecto, o material celulósico é material herbáceo (incluindo safras de energia). Em um outro aspecto, o material celulósico é resíduo sólido municipal. Em um outro aspecto, o material celulósico é resíduo de moinho de polpa e papel. Em um outro aspecto, o material celulósico é papel residual. Em um outro aspecto, o material celulósico é madeira (incluindo resíduo florestal).

[0038] Em um outro aspecto, o material celulósico é arundo. Em um outro aspecto, o material celulósico é bagaço. Em um outro aspecto, o material celulósico é bambu. Em um outro aspecto, o material celulósico é sabugo de milho. Em um outro aspecto, o material celulósico é fibra de milho. Em um outro aspecto, o material celulósico é forragem de milho. Em um outro aspecto, o material celulósico é *miscanthus*. Em um outro aspecto, o material celulósico é casca de laranja. Em um outro aspecto, o material celulósico é palha de arroz. Em um outro aspecto, o material celulósico é switchgrass. Em um outro aspecto, o material celulósico é palha de trigo.

[0039] Em um outro aspecto, o material celulósico é aspen. Em um outro aspecto, o material celulósico é eucalipto. Em um outro aspecto, o material celulósico é abeto. Em um outro aspecto, o material celulósico é pinheiro. Em um outro aspecto, o material celulósico é choupo. Em um outro aspecto, o material celulósico é abeto vermelho. Em um outro aspecto, o

material celulósico é salgueiro.

[0040] Em um outro aspecto, o material celulósico é celulose de alga. Em um outro aspecto, o material celulósico é celulose bacteriana. Em um outro aspecto, o material celulósico é fiapos de algodão. Em um outro aspecto, o material celulósico é papel de filtro. Em um outro aspecto, o material celulósico é celulose microcristalina. Em um outro aspecto, o material celulósico é celulose tratada com ácido fosfórico.

[0041] Em um outro aspecto, o material celulósico é uma biomassa aquática. Como aqui usado o termo “biomassa aquática” significa biomassa produzida em um ambiente aquático por um processo de fotossíntese. A biomassa aquática pode ser algas, plantas emergentes, plantas de folha flutuante, ou plantas submergidas.

[0042] O material celulósico pode ser usado como tal ou pode ser submetido ao pré-tratamento, usando métodos convencionais conhecidos na técnica, como aqui descrito. Em um aspecto preferido, o material celulósico é pré-tratado.

[0043] **Sequência codificadora:** O termo “sequência codificadora” significa um polinucleotídeo, que diretamente especifica a aminoácido sequência de um polipeptídeo. Os limites da sequência codificadora são no geral determinados por uma matriz de leitura aberta, que usualmente começa com um códon de partida tal como ATG, GTG ou TTG e extremidades com um códon de parada tal como TAA, TAG, ou TGA. A sequência codificadora pode ser um polinucleotídeo de DNA genômico, cDNA, DNA sintético ou uma combinação destes.

[0044] **Sequências de controle:** O termo “sequências de controle” significa sequências de ácido nucleico necessárias para a expressão de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo. Cada sequência de controle pode ser nativa (isto é, do mesmo gene) ou estranha (isto é, de um gene diferente) ao polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo ou nativo ou

estranho entre si. Tais sequências de controle incluem, mas não são limitados a, uma sequência líder, sequência de poliadenilação, sequência pró-peptídeo, promotor, sequência de sinal de peptídeo, e terminador de transcrição. Em um mínimo, as sequências de controle incluem um promotor, e sinais de parada transcricional e traducional. As sequências de controle podem ser fornecidas com ligadores com o propósito de introduzir sítios de restrição específicos que facilitam a ligação das sequências de controle com a região codificadora do polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo.

[0045]           **Endoglicanase:** O termo “endoglicanase” significa uma endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glicano 4-glicanoidrolase (E.C. 3,2,1,4), que catalisa endoidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose, derivados de celulose (tais como carboximetil celulose e hidroxietil celulose), liquenina, ligações beta-1,4 em beta-1,3 glicanos mistos tais como beta-D-glicanos ou xiloglicanos de cereal, e outros materiais vegetais contendo componentes celulósicos. A atividade de endoglicanase pode ser determinada medindo-se a redução na viscosidade do substrato ou aumento nas extremidades redutoras determinada por um ensaio de açúcar redutor (Zhang *et al.*, 2006, *Biotechnology Advances* 24: 452-481). Para os propósitos da presente invenção, a atividade de endoglicanase é determinada usando carboximetil celulose (CMC) como substrato de acordo com o procedimento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268, no pH 5, 40°C.

[0046]           **Expressão:** O termo “expressão” inclui qualquer etapa envolvida na produção de um polipeptídeo incluindo, mas não limitado a, transcrição, modificação pós-transcricional, tradução, modificação pós-traducional e secreção.

[0047]           **Vetor de expressão:** O termo “vetor de expressão” significa uma molécula de DNA linear ou circular que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo e é operavelmente ligado às sequências de controle que fornecem a sua expressão.

[0048] **Família 61 da glicosídeo hidrolase:** O termo “Família 61 da glicosídeo hidrolase” ou “Família GH61” ou “GH61” significa um polipeptídeo que cai dentro da Família 61 da glicosídeo hidrolase de acordo com Henrissat B., 1991, A classification of glycosil hydrolases com base em amino-acid sequence similarities, *Biochem. J.* 280: 309-316, e Henrissat B., e Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosil hydrolases, *Biochem. J.* 316: 695-696. As enzimas nesta família foram originalmente classificadas como uma família da glicosídeo hidrolase com base na medição da atividade da endo-1,4-beta-D-glicanase muito fraca em um membro da família. A estrutura e modo de ação destas enzimas não são canônicos e elas não podem ser consideradas como glicosidases genuínas. Entretanto, elas são mantidas na classificação CAZy com base na sua capacidade para realçar a ruptura de lignocelulose quando usada em conjunção com uma celulase ou uma mistura de celulases.

[0049] **Feruloil esterase:** O termo “feruloil esterase” significa uma 4-hidróxi-3-metoxicinamoil-açúcar hidrolase (EC 3,1,1,73) que catalisa a hidrólise de grupos 4-hidróxi-3-metoxicinamoíla (feruloíla) de açúcar esterificado, que é usualmente arabinose em substratos “naturais”, para produzir ferulato (4-hidróxi-3-metoxicinamato). A feruloil esterase também é conhecida como ácido ferúlico esterase, hidroxicinamoil esterase, FAE-III, éster cinamoílico hidrolase, FAEA, cinAE, FAE-I, ou FAE-II. Para os propósitos da presente invenção, a atividade da feruloil esterase é determinada usando 0,5 mM de p-nitrofenilferulato como substrato em 50 mM de acetato de sódio pH 5,0. Uma unidade de feruloil esterase é igual à quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de ânion p-nitrofenolato por minuto no pH 5, 25°C.

[0050] **Fragmento:** O termo “fragmento” significa um polipeptídeo tendo um ou mais (vários) aminoácidos ausentes do terminal amino e/ou carboxila de um polipeptídeo maduro; em que o fragmento tem atividade

biológica.

[0051] **Enzima hemicelulolítica ou hemicelulase:** Os termos “enzima hemicelulolítica” ou “hemicelulase” significam uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas que hidrolisam um material hemicelulósico. Ver, por exemplo, Shallom, D. e Shoham, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion In Microbiology*, 2003, 6(3): 219-228). As hemicelulases são componentes chave na degradação de biomassa vegetal. Os exemplos de hemicelulases incluem, mas não são limitados a, uma acetilmanana esterase, uma acetilxilano esterase, uma arabinanase, uma arabinofuranosidase, uma ácido coumárico esterase, uma feruloil esterase, uma galactosidase, uma glicuronidase, uma glicuronoil esterase, uma mananase, uma manosidase, uma xilanase, e uma xilosidase. Os substratos destas enzimas, as hemiceluloses, são um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados e lineares que são ligados por intermédio de ligações de hidrogênio às microfibrilas de celulose na parede da célula vegetal, reticulando-as em uma rede robusta. As hemiceluloses também são covalentemente ligadas à lignina, formando junto com a celulose uma estrutura altamente complexa. A estrutura variável e a organização das hemiceluloses requerem a ação combinada de muitas enzimas para a sua degradação completa. Os módulos catalíticos das hemicelulases são glicosídeo hidrolases (GHs) que hidrolisam ligações glicosídicas, ou carboidrato esterases (CEs), que hidrolisam as ligações de grupos laterais de éster de acetato ou ácido ferúlico. Estes módulos catalíticos, com base na homologia de sua sequência primária, podem ser designados dentro das famílias GH e CE. Algumas famílias, com uma dobra similar global, podem ser agrupadas ainda em clãs, alfabeticamente marcados (por exemplo, GH-A). Uma classificação mais informativa e atualizada destas e outras enzimas ativas em carboidrato está disponível na base de dados Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy). As atividades de enzimas hemicelulolíticas podem ser medidas de acordo com Ghose e Bisaria, 1987,

Pure & Appl. Chem. 59: 1739-1752, em uma temperatura adequada, por exemplo, 50°C, 55°C, ou 60°C e pH, por exemplo, 5,0 ou 5,5.

[0052] **Condições de alta severidade:** O termo “condições de alta severidade” significa para as sondas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, pré-hibridização e hibridização a 42°C em 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramas/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado e 50 % de formamida, a seguir dos procedimentos de Southern blotting padrão por 12 a 24 horas. O material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 65°C.

[0053] **Célula hospedeira:** O termo “célula hospedeira” significa qualquer tipo de célula que seja suscetível à transformação, transfecção ou transdução, e outros com uma construção de ácido nucleico ou vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo da presente invenção. O termo “célula hospedeira” abrange qualquer progênie de uma célula precursora que não é idêntica à célula precursora devido às mutações que ocorrem durante a replicação.

[0054] **Isolado:** O termo “isolado” significa uma substância em uma forma ou ambiente que não ocorre na natureza. Os exemplos não limitantes de substâncias isoladas incluem (1) qualquer substância que não ocorre naturalmente, (2) qualquer substância incluindo, mas não limitada a, qualquer enzima, variante, ácido nucleico, proteína, peptídeo ou cofactor, que é pelo menos parcialmente removido de um ou mais ou todos dos constituintes que ocorrem naturalmente com os quais o mesmo é associado na natureza; (3) qualquer substância modificada pela mão do homem em relação àquela substância encontrada na natureza; ou (4) qualquer substância modificada pelo aumento da quantidade da substância em relação aos outros componentes com os quais o mesmo está naturalmente associado (por exemplo, cópias múltiplas de um gene que codifica a substância; uso de um promotor mais forte do que o promotor naturalmente associado com o gene que codifica a

substância). O polipeptídeo pode ser usado em aplicações industriais na forma de um produto de caldo de fermentação, isto é, o polipeptídeo é um componente de um caldo de fermentação usado como um produto em aplicações industriais (por exemplo, produção de etanol). O produto de caldo de fermentação além do polipeptídeo compreenderá ingredientes adicionais usados no processo de fermentação, tal como, por exemplo, células (incluindo, as células hospedeiras que contém o gene que codifica o polipeptídeo que são usadas para produzir o polipeptídeo de interesse), fragmentos de célula, biomassa, meio de fermentação e/ou produtos de fermentação. O caldo de fermentação pode ser opcionalmente submetido a uma ou mais etapas de purificação (incluindo filtração) para remover ou reduzir um mais componentes de um processo de fermentação. Conseqüentemente, uma substância isolada pode ser apresentada em um tal produto de caldo de fermentação.

[0055]       **Condições de severidade baixa:** O termo “condições de severidade baixa” significa para sondas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, pré-hibridização e hibridização a 42°C em 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramas/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado e 25 % de formamida, seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão por 12 a 24 horas. O material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 50°C.

[0056]       **Polipeptídeo maduro:** O termo “polipeptídeo maduro” significa um polipeptídeo na sua forma final a seguir da tradução e quaisquer modificações pós-traducionais, tais como processamento de terminal N, truncagem de terminal C, glicosilação, fosforilação, etc. É conhecido na técnica que uma célula hospedeira pode produzir uma mistura de dois ou mais polipeptídeos maduros diferentes (isto é, com um aminoácido de terminal C e/ou terminal N diferente) expressado pelo mesmo polinucleotídeo. Também é conhecido na técnica que células hospedeiras diferentes processam

polipeptídeos de modo diferente e assim, uma célula hospedeira que expressa um polinucleotídeo pode produzir um polipeptídeo maduro diferente (por exemplo, que tem um aminoácido de terminal C e/ou terminal N diferente) quando comparado a uma outra célula hospedeira que expressa o mesmo polinucleotídeo. O polipeptídeo maduro pode ser prognosticado usando o programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6).

[0057]       **Sequência que codifica polipeptídeo maduro:** O termo “sequência que codifica polipeptídeo maduro” significa um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo maduro tendo atividade biológica. A sequência que codifica o polipeptídeo maduro pode ser prognosticada usando o programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*).

[0058]       **Condições de média severidade:** O termo “condições de média severidade” significa sondas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, pré-hibridização e hibridização a 42°C em 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramas/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado e 35 % de formamida, seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão por 12 a 24 horas. O material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 55°C.

[0059]       **condições de severidade média-alta:** O termo “condições de severidade média-alta” significa para sondas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, pré-hibridização e hibridização a 42°C em 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramas/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado e 35 % de formamida, seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão por 12 a 24 horas. O material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 60°C.

[0060]       **Construção de ácido nucleico:** O termo “construção de ácido nucleico” significa uma molécula de ácido nucleico, de filamento único ou duplo, que é isolado de um gene que ocorre naturalmente ou é modificado para conter segmentos de ácidos nucleicos em uma maneira que de outro

modo não existiriam na natureza ou que é sintético, que compreende uma ou mais sequências de controle.

[0061]       **Operavelmente ligado:** O termo “operavelmente ligado” significa uma configuração na qual uma sequência de controle é colocada em uma posição apropriada em relação à sequência codificadora de um polinucleotídeo tal que a sequência de controle direciona a expressão da sequência codificadora.

[0062]       **Fragmento de polipeptídeo:** O termo “fragmento” significa um polipeptídeo que tem um ou mais (por exemplo, vários) aminoácidos deletados do terminal de amino e/ou carboxila de um polipeptídeo maduro, em que o fragmento tem atividade biológica.

[0063]       **Polipeptídeo que tem atividade realçadora celulolítica:** O termo “polipeptídeo que tem atividade realçadora celulolítica” significa um polipeptídeo GH61 que catalisa o realce da hidrólise de um material celulósico pela enzima que tem atividade celulolítica. Para os propósitos da presente invenção, a atividade realçadora celulolítica é determinada medindo-se o aumento em açúcares redutores ou o aumento do total da celobiose e glicose a partir da hidrólise de um material celulósico pela enzima celulolítica sob as condições que seguem: 1 a 50 mg de proteína total/g de celulose em PCS, em que a proteína total é compreendida de 50 a 99,5 % p/p de proteína de enzima celulolítica e 0,5 a 50 % p/p de proteína de um polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica por 1 a 7 dias em uma temperatura adequado, por exemplo, 50°C, 55°C, ou 60°C e pH, por exemplo, 5,0 ou 5,5, comparada com uma hidrólise de controle com carga de proteína total igual sem atividade realçadora celulolítica (1 a 50 mg de proteína celulolítica/g de celulose em PCS). Em um aspecto preferido, uma mistura de CELLUCLAST® 1,5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) na presença de 2 a 3 % de peso de proteína total de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (recombinantemente produzida em *Aspergillus oryzae* de acordo com a WO

02/095014) ou 2 a 3 % de peso de proteína total da beta-glucosidase de *Aspergillus fumigatus* (recombinantemente produzido em *Aspergillus oryzae* como descrito na WO 2002/095014) de carga de proteína de celulase é usado como a fonte da atividade celulolítica.

[0064] Os polipeptídeos GH61 que têm atividade realçadora celulolítica realçam a hidrólise de um material celulósico catalisado pela enzima que tem atividade celulolítica pela redução da quantidade de enzima celulolítica requerida para atingir o mesmo grau de hidrólise preferivelmente pelo menos 1,01 vezes, por exemplo, pelo menos 1,05 vezes, pelo menos 1,10 vezes, pelo menos 1,25 vezes, pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, ou pelo menos 20 vezes.

[0065] **Identidade de sequência:** A relacionabilidade entre duas sequências de aminoácido ou entre duas sequências de nucleotídeo é descrita pelos parâmetros “identidade de sequência”.

[0066] Para os propósitos da presente invenção, a identidade de sequência entre duas sequências de aminoácido é determinado usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferivelmente a versão 3.0.0, 5.0.0 ou posteriores. Os parâmetros usados são penalidade de abertura de intervalo de 10, penalidade de extensão de intervalo de 0,5, e a matriz de substituição EBLOSUM62 (EMBOSS versão de BLOSUM62). A saída do Needle rotulado “identidade mais longa” (obtida usando a opção -nobrief) é usado como a identidade por cento deual e é calculada como segue:

$$\text{(Resíduos Idênticos x 100)} / (\text{Comprimento de Alinhamento} - \text{Número Total de Intervalos no Alinhamento})$$

Para os propósitos da presente invenção, a identidade de

sequência entre duas sequências de desoxirribonucleotídeo é determinada usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, supra) como implementado no programa Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, supra), preferivelmente a versão 3.0.0, 5.0.0 ou posteriores. Os parâmetros usados são penalidade de abertura de intervalo de 10, penalidade de extensão de intervalo de 0,5, e o EDNAFULL (versão EMBOSS de NCBI NUC4.4). A saída de Needle rotulada “identidade mais longa” (obtida usando a opção -nobrief) é usada como a identidade por cento deunal e é calculada como segue:

$$\frac{(\text{Desoxirribonucleotídeos Idênticos} \times 100)}{(\text{Comprimento de Alinhamento} - \text{Número total de Intervalos no Alinhamento})}$$

[0067] **Subsequência:** O termo “subsequência” significa um polinucleotídeo tendo um ou mais (por exemplo, vários) nucleotídeos ausentes da extremidade 5’ e/ou 3’ de uma sequência que codifica o polipeptídeo maduro; em que a subsequência codifica um fragmento tendo atividade biológica.

[0068] **Cana de açúcar:** O termo “cana de açúcar” significa qualquer grama perene alta do gênero *Saccharum* (família Poaceae, tribo Andropogoneae). Nativa das regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, a cana de açúcar tem caules volumosos, nodosos, fibrosos que são ricos em açúcar e medem de dois a seis metros (seis a dezenove pés) de altura. Todas as espécies da cana e açúcar inter cruzadas e os cultívars comerciais principais são híbridos complexos.

[0069] **Bagaço da cana de açúcar:** O termo “bagaço da cana de açúcar” significa o resíduo fibroso que permanece depois que os caules de cana de açúcar são triturados para extrair o seu suco.

[0070] **Refugo da cana de açúcar:** O termo “refugo da cana de açúcar” significa as folhas verdes, folhas secas e topos coletadas da cana de

açúcar. As folhas verdes são as folhas verdes e amarelas, as folhas secas são folhas que já secaram, normalmente amarronzadas na cor e os topos que são a part da planta de cana entre a extremidade de topo e o último nó do caule.

[0071] **Xilanase:** O termo “xilanase” significa uma 1,4-beta-D-xilanoxiloidrolase (E.C. 3,2,1,8) que catalisa a endoídrólise de ligações 1,4-beta-D-xilosídicas em xilanos. Para os propósitos da presente invenção, a atividade de xilanase é determinada com 0,2 % de AZCL-arabinoxilano como substrato em 0,01 % de TRITON X-100 e 200 mM de tampão de fosfato de sódio pH 6 a 37°C. Uma unidade de atividade de xilanase é definida como 1,0 µmol de azurina produzido por minuto a 37°C, pH 6 a partir de 0,2 % de AZCL-arabinoxilano como substrato em 200 mM de tampão de fosfato de sódio pH 6.

[0072] **Material contendo Xilano:** O termo “material contendo xilano” significa qualquer material que compreende um polissacarídeo de parede de célula vegetal contendo uma cadeia principal de resíduos de xilose ligados em beta-(1-4). Xilanos de plantas terrestres são heteropolímeros que possuem uma cadeia principal de beta-(1-4)-D-xilopiranosose, que é ramificada pelas cadeias de carboidrato curtas. Eles compreendem o ácido D-glicurônico ou seu éster 4-O-metílico, L-arabinose, e/ou vários oligossacarídeos, compostos de D-xilose, L-arabinose, D- ou L-galactose, e D-glicose. Os polissacarídeos do tipo xilano podem ser divididos em homoxilanos e heteroxilanos, que incluem glicuronoxilanos, (arabino)glicuronoxilanos, (glicurono)arabinoxilanos, arabinoxilanos, e heteroxilanos complexos. Ver, por exemplo, Ebringerova *et al.*, 2005, Adv. Polim. Sci. 186: 1-67.

[0073] Nos métodos da presente invenção, qualquer material contendo xilano pode ser usado. Em um aspecto preferido, o material contendo xilano é lignocelulose.

[0074] **Atividade que degrada xilano ou atividade xilanolítica:** Os termos “atividade que degrada xilano” ou “atividade xilanolítica” significam

uma atividade biológica que hidrolisa material contendo xilano. Os dois métodos básicos para medir a atividade xilanolítica incluem: (1) medir a atividade xilanolítica total, e (2) medir as atividades xilanolíticas individuais (por exemplo, endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabino-furanosidasas, alfa-glicuronidasas, acetilxilano esterases, feruloil esterases, e alfa-glicuronil esterases). O progresso recente nos ensaios de enzimas xilanolíticas foi resumido em várias publicações incluindo Biely e Puchard, Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes, 2006, Journal of the Science of Food and Agriculture 86(11): 1636-1647; Spanikova e Biely, 2006, Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by Schizophillum commune, FEBS Letters 580(19): 4597-4601; Herrmann, Vrsanska, Jurickova, Hirsch, Biely, e Kubicek, 1997, The beta-D-xilosydase of Trichoderma reesei is a multifunctional beta-D-xilan xilohydrolase, Biochemical Journal 321: 375-381.

[0075] A atividade que degrada xilano total pode ser medida determinando-se os açúcares redutores formados de vários tipos de xilano, incluindo, por exemplo, xilanos de forragem de aveia, madeira de faia, e madeira de lariço, ou pela determinação fotométrica de fragmentos de xilano tingidos liberados de vários xilanos covalentemente tingidos. O ensaio de atividade xilanolítica total mais comum é fundamentado na produção de açúcares redutores de 4-O-metil glicuronoxilano polimérico como descrito em Bailey, Biely, Poutanen, 1992, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, Journal of Biotechnology 23(3): 257-270. A atividade de xilanase também pode ser determinada com 0,2 % de AZCL-arabinoxilano como substrato em 0,01 % de Triton X-100 e 200 mM de tampão de fosfato de sódio pH 6 a 37°C. Uma unidade de atividade de xilanase é definida como 1,0 µmol de azurina produzida por minuto a 37°C, pH 6 de 0,2 % de AZCL-arabinoxilano como substrato em 200 mM de tampão de fosfato de sódio pH 6.

[0076] Para os propósitos da presente invenção, a atividade que degrada xilano é determinada medindo-se o aumento na hidrólise de xilano da madeira do vidoeiro (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, MO, USA) pela(s) enzima(s) que degradam xilano sob as seguintes condições típicas: reações de 1 ml, 5 mg/ml de substrato (sólidos totais), 5 mg de proteína xilanolítica /g de substrato, 50 mM de acetato de sódio pH 5, 50°C, 24 horas, análise de açúcar usando o ensaio da hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico (PHBAH) como descrito por Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal. Biochem 47: 273-279.

[0077] **Variante:** O termo “variante” significa um polipeptídeo tendo atividade biológica que compreende uma alteração, isto é, uma substituição, inserção, e/ou deleção em uma ou mais (por exemplo, vários) posições. Uma substituição significa a substituição do aminoácido que ocupa uma posição com um aminoácido diferente; uma deleção significa a remoção do aminoácido que ocupa uma posição; e uma inserção significa adicionar um aminoácido adjacente a e imediatamente a seguir do aminoácido que ocupa uma posição.

[0078] **Condições de severidade muito alta:** O termo “condições de severidade muito alta” significa para sondas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, pré-hibridização e hibridização a 42°C em 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramas/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado e 50 % de formamida, seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão por 12 a 24 horas. O material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 70°C.

[0079] **Condições de severidade muito baixa:** O termo “condições de severidade muito baixa” significa para as sondas de pelo menos 100 nucleotídeos no comprimento, pré-hibridização e hibridização a 42°C em 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramas/ml de DNA de esperma de salmão cisalhado e desnaturado e 25 % de formamida, seguindo os procedimentos de

Southern blotting padrão por 12 a 24 horas. O material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando 2X SSC, 0,2 % de SDS a 45°C.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[0080] A presente invenção diz respeito a métodos de degradar ou converter refugo da cana de açúcar, que compreende: separar o refugo da cana de açúcar da cana de açúcar e sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima. Em um aspecto, o método compreende adicionalmente recuperar o refugo da cana de açúcar degradado ou convertido. Produtos adequados de degradação ou conversão do refugo da cana de açúcar podem ser separados do refugo da cana de açúcar insolúvel usando tecnologia bem conhecida na técnica tal como, por exemplo, centrifugação, filtração e sedimentação por gravidade.

[0081] A presente invenção também diz respeito a métodos de produzir um produto de fermentação, que compreende: (a) colher e separar o refugo da cana de açúcar da cana de açúcar; (b) pré-tratar o refugo da cana de açúcar; (c) sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima; (d) fermentar o refugo da cana de açúcar sacarificado com um ou mais (por exemplo, vários) microrganismos de fermentação para produzir o produto de fermentação; e (e) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[0082] A presente invenção também diz respeito a métodos de produzir um produto de fermentação, que compreende: (a) sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima; (b) fermentar o refugo da cana de açúcar sacarificado com um ou mais (por exemplo, vários) microrganismos de fermentação para produzir o produto de fermentação; e (c) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[0083] A presente invenção também diz respeito a métodos de fermentar o refugo da cana de açúcar, que compreende: fermentar o refugo da

cana de açúcar com um ou mais (por exemplo, vários) microrganismos de fermentação, em que o refugo da cana de açúcar é sacarificado com uma composição de enzima. Em um aspecto, a fermentação do refugo da cana de açúcar produz um produto de fermentação. Em um outro aspecto, o método compreende adicionalmente recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[0084] Em um aspecto, o refugo da cana de açúcar é combinado com bagaço da cana de açúcar durante a hidrólise (sacarificação) com a composição de enzima. O bagaço da cana de açúcar pode ser pré-tratado de acordo com qualquer um dos métodos aqui descritos. Além disso, outros aspectos dos métodos da presente invenção também são aplicáveis à combinação do refugo da cana de açúcar e o bagaço da cana de açúcar.

[0085] O processamento do refugo da cana de açúcar de acordo com a presente invenção pode ser realizado usando processos convencionais na técnica. Além disso, os métodos da presente invenção podem ser implementados usando qualquer aparelho de processamento de biomassa convencional configurado para operar de acordo com a invenção.

[0086] A hidrólise (sacarificação) e fermentação, separada ou simultânea, incluem, mas não são limitados à, hidrólise e fermentação separadas (SHF); sacarificação e fermentação simultâneas (SSF); sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF); hidrólise e fermentação híbridas (HHF); hidrólise separada e co-fermentação (SHCF); hidrólise e co-fermentação híbridas (HHCF); e conversão microbiana direta (DMC), também algumas vezes chamada de bioprocessamento consolidado (CBP). SHF usa etapas de processo separadas para primeiro hidrolisar enzimaticamente o material celulósico para açúcares fermentáveis, por exemplo, glicose, celobiose e monômeros de pentose e depois fermentar os açúcares fermentáveis para etanol. Na SSF, a hidrólise enzimática do material celulósico e a fermentação de açúcares para etanol são combinadas em uma

etapa (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, no *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). SSCF envolve a co-fermentação de açúcares múltiplos (Sheehan, J. e Himmel, M., 1999, Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol, *Biotechnol. Prog.* 15: 817-827). HHF envolve uma etapa de hidrólise separada e além disso uma etapa de sacarificação e hidrólise simultâneas, que pode ser realizada no mesmo reator. As etapas em um processo de HHF podem ser realizadas em temperaturas diferentes, isto é, sacarificação enzimática em high temperatura seguido por SSF em uma temperatura mais baixa que a cepa de fermentação possa tolerar. DMC combina todos os três processos (produção de enzima, hidrólise e fermentação) em uma ou mais (por exemplo, várias) etapas onde o mesmo organismo é usado para produzir as enzimas para a conversão do material celulósico aos açúcares fermentáveis e para converter os açúcares fermentáveis em um produto final (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zil, W. H. e Pretorius, I. S., 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 66: 506-577). É aqui entendido que qualquer método conhecido na técnica que compreende pré-tratamento, hidrólise enzimática (sacarificação), fermentação, ou uma combinação destes, pode ser usado na prática dos métodos da presente invenção.

[0087] Um aparelho convencional pode incluir um reator de lote alimentado agitado, um reator de lote agitado, um reator agitado de fluxo contínuo com ultrafiltração, e/ou um reator de coluna de fluxo pistão contínuo (Fernanda de Castilhos Corazza, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin e Ivo Neitzel, 2003, Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hidrólise, *Acta Scientiarum. Technology* 25: 33-38; Gusakov, A. V. e Sinitsyn, A. P., 1985, Kinetics of a hidrolisis enzymatic of cellulose: 1. A

mathematical model for um batch reactor process, *Enz. Microb. Technol.* 7: 346-352), um reator de atrito (Ryu, S. K. e Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using a attrition bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65), ou um reator com agitação intensiva induzida por um campo eletromagnético (Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 141-153). Os tipos de reator adicionais incluem: de leito fluidizado, de manta de fluxo ascendente, imobilizado e reatores do tipo extrusora para hidrólise e/ou fermentação.

[0088] Colheita. A cana de açúcar é tipicamente colhida de modo mecânico e carregada em reboques de caminhão. A máquina colhedeira coleta a cana, a tritura em pequenos pedaços (2 a 5 polegadas) e a transfere para os reboques. Nesse meio tempo, a máquina colhedeira também separa as partículas mais leves, tipicamente partes secas, que são deixadas no campo. Os reboques são transportados a um sítio para a quantificação e avaliação preliminar. Neste ponto, restolhos, folhas verdes, folhas secas e topos são quantificados. A cana triturada dos reboques é carregada nos caminhões de transporte e liberados a um moinho para o processamento da cana de açúcar. No moinho a cana de açúcar coletada é separada em cana e folhas e galhos (topos e folhas). A cana pode ser usada para a extração de açúcar usando processos padrão conhecidos na técnica. A fração de refugo é coletada para o uso de acordo com os métodos da presente invenção.

[0089] Separação. na prática dos métodos da presente invenção, qualquer processo de separação conhecido na técnica pode ser usado para separar o refugo da cana de açúcar dos caules. Os exemplos não limitantes dos processos de separação incluem, mas não são limitados a, tecnologia gravitacional, peneiramento, separação gravitacional, ciclone de ar e filtração.

[0090] Pré-tratamento. Na prática dos métodos da presente invenção,

qualquer processo de pré-tratamento conhecido na técnica pode ser usado para romper os componentes do refugo de cana de açúcar da parede da célula vegetal (Chandra *et al.*, 2007, Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 108: 67-93; Galbe e Zacchi, 2007, Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Adv. Biochem. Engin. / Biotechnol.* 108: 41-65; Hendriks e Zeeman, 2009, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technol.* 100: 10-18; Mosier *et al.*, 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technol.* 96: 673-686; Taherzadeh e Karimi, 2008, Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, *Int. J. of Mol. Sci.* 9: 1621-1651; Yang e Wyman, 2008, Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol, *Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofpr.* 2: 26-40).

[0091] O material celulósico também pode ser submetido à redução do tamanho da partícula, peneiramento, pré-embecimento, umectação, lavagem e/ou condicionamento antes do pré-tratamento usando métodos conhecidos na técnica.

[0092] Os pré-tratamentos convencionais incluem, mas não são limitados a, pré-tratamento com vapor (com ou sem explosão), pré-tratamento com ácido diluído, pré-tratamento com água quente, pré-tratamento alcalino, pré-tratamento com cal, oxidação úmida, explosão úmida, explosão de fibra com amônia, pré-tratamento com *organosolv* e pré-tratamento biológico. Os pré-tratamentos adicionais incluem pré-tratamentos com percolação com amônia, ultra-som, eletroporação, microonda, CO<sub>2</sub> supercrítico, H<sub>2</sub>O supercrítica, ozona, líquido iônico e irradiação gama.

[0093] O material celulósico pode ser pré-tratado antes da hidrólise e/ou fermentação. O pré-tratamento é preferivelmente realizado antes da hidrólise. Alternativamente, o pré-tratamento pode ser realizado

simultaneamente com hidrólise enzimática para liberar açúcares fermentáveis, tais como glicose, xilose ou celobiose. Na maioria dos casos a própria etapa de pré-tratamento resulta em alguma conversão da biomassa aos açúcares fermentáveis (mesmo na ausência de enzimas).

[0094] Pré-tratamento com vapor. No pré-tratamento com vapor, o material celulósico é aquecido para romper os componentes da parede de célula vegetal, que incluem lignina, hemicelulose e celulose para tornar a celulose e outras frações, por exemplo, hemicelulose, acessíveis às enzimas. O material celulósico é passado para ou através de um vaso de reação onde vapor é injetado para aumentar a temperatura para a temperatura e pressão requeridas e são retidas nesse ponto durante o tempo de reação desejado. O pré-tratamento com vapor é preferivelmente realizado de 140 a 250°C, por exemplo, de 160 a 200°C ou de 170 a 190°C, onde a faixa de temperatura ideal depende da adição de um catalisador químico. O tempo de residência para o pré-tratamento com vapor é preferivelmente de 1 a 60 minutos, por exemplo, de 1 a 30 minutos, de 1 a 20 minutos, de 3 a 12 minutos ou de 4 a 10 minutos, onde o tempo de residência ideal depende da faixa de temperatura e da adição de um catalisador químico. O pré-tratamento com vapor permite cargas de sólidos relativamente altas, de modo que o material celulósico é geralmente apenas úmido durante o pré-tratamento. O pré-tratamento com vapor é frequentemente combinado com uma descarga explosiva do material depois do pré-tratamento, que é conhecida como explosão de vapor, isto é, descarga rápida até a pressão atmosférica e fluxo turbulento do material para aumentar a área de superfície acessível pela fragmentação (Duff e Murray, 1996, *Bioresource Technology* 855: 1-33; Galbe e Zacchi, 2002, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 618-628; Pedido de Patente U.S. Nº 20020164730). Durante o pré-tratamento com vapor, os grupos acetil hemicelulose são clivados e o ácido resultante autocatalisa a hidrólise parcial da hemicelulose aos monossacarídeos e oligossacarídeos. A lignina é

removida apenas em um grau limitado.

[0095] Pré-tratamento Químico: O termo “tratamento químico” refere-se a qualquer pré-tratamento químico que promove a separação e/ou liberação de celulose, hemicelulose, e/ou lignina. Um tal pré-tratamento pode converter celulose cristalina em celulose amorfa. Os exemplos de processos de pré-tratamento químicos adequados incluem, por exemplo, pré-tratamento com ácido diluído, pré-tratamento com cal, oxidação úmida, fibra de amônia/explosão de congelamento (AFEX), percolação com amônia (APR) e pré-tratamentos com *organosolv*.

[0096] Um catalisador tal como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou SO<sub>2</sub> (tipicamente de 0,3 a 5 % p/p) é frequentemente adicionado antes do pré-tratamento com vapor, o que diminui o tempo e a temperatura, aumenta a recuperação e melhora a hidrólise enzimática (Ballesteros *et al.*, 2006, Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132: 496-508; Varga *et al.*, 2004, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116: 509-523; Sassner *et al.*, 2006, Enzyme Microb. Technol. 39: 756-762).

[0097] No pré-tratamento com ácido diluído, o refugo de cana de açúcar é misturado com ácido diluído, tipicamente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e água para formar uma pasta fluida, aquecida pelo vapor até a temperatura desejada e depois de um tempo de residência descarregado até a pressão atmosférica. O pré-tratamento com ácido diluído pode ser realizado com vários projetos de reator, por exemplo, reator de fluxo plugado, reatores de contra-corrente ou reatores de leito de recuo em contra-corrente contínuo (Duff e Murray, 1996, supra; Schell *et al.*, 2004, Bioresource Technol. 91: 179-188; Lee *et al.*, 1999, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 65: 93-115).

[0098] Vários métodos de pré-tratamento sob condições alcalinas também podem ser usados. Estes pré-tratamentos alcalinos incluem, mas não são limitados a, hidróxido de sódio, cal, oxidação úmida, percolação com amônia (APR) e fibra de amônia/explosão de congelamento (AFEX).

[0099] O pré-tratamento com cal é realizado com óxido de cálcio ou

hidróxido de cálcio em temperaturas de 85 a 150°C e tempos de residência de 1 hora a vários dias (Wyman *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 1959-1966; Mosier *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 673-686). A WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900 e WO 2006/110901 divulgam métodos de pré-tratamento usando amônia.

[00100] A oxidação úmida é um pré-tratamento térmico realizado tipicamente de 180 a 200°C por 5 a 15 minutos com a adição de um agente oxidativo tal como peróxido de hidrogênio ou pressão excessiva de oxigênio (Schmidt e Thomsen, 1998, *Bioresource Technol.* 64: 139-151; Palonen *et al.*, 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 1-17; Varga *et al.*, 2004, *Biotechnol. Bioeng.* 88: 567-574; Martin *et al.*, 2006, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1669-1677). O pré-tratamento é realizado preferivelmente em 1 a 40 % de matéria seca, por exemplo, de 2 a 30 % de matéria seca ou de 5 a 20 % de matéria seca e frequentemente o pH inicial é aumentado pela adição de álcali tal como carbonato de sódio.

[00101] Uma modificação do método de pré-tratamento de oxidação úmida, conhecida como explosão úmida (combinação de oxidação úmida e explosão de vapor), pode movimentar a matéria seca em até 30 %. Na explosão úmida, o agente oxidante é introduzido durante o pré-tratamento depois de um certo tempo de residência. O pré-tratamento é depois terminado pela descarga até a pressão atmosférica (WO 2006/032282).

[00102] A explosão com fibra de amônia (AFEX) envolve tratar o refugo de cana de açúcar com amônia líquida ou gasosa em temperaturas moderadas tais como 90 a 150°C e alta pressão tal como 17 a 20 bar por 5 a 10 minutos, onde o teor de matéria seca pode ser tão alta quanto 60 % (Gollapalli *et al.*, 2002, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 23-35; Chundawat *et al.*, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 96: 219-231; Alizadeh *et al.*, 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 1133-1141; Teymouri *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 2014-2018). Durante o pré-tratamento com AFEX a celulose e a

hemicelulose permanecem relativamente intactas. Os complexos de lignina-carboidrato são clivados.

[00103] O pré-tratamento com *organosolv* deslignifica o refugo de cana de açúcar pela extração usando etanol aquoso (etanol de 40 a 60 %) de 160 a 200°C por 30 a 60 minutos (Pan *et al.*, 2005, *Biotechnol. Bioeng.* 90: 473-481; Pan *et al.*, 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 94: 851-861; Kurabi *et al.*, 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 219-230). O ácido sulfúrico é usualmente adicionado como um catalisador. No pré-tratamento com *organosolv*, a maioria da hemicelulose e da lignina é removida.

[00104] Outros exemplos de métodos de pré-tratamento adequados são descritos por Schell *et al.*, 2003, *Appl. Biochem. e Biotechnol.* Vol. 105-108, p. 69-85 e Mosier *et al.*, 2005, *Bioresource Technology* 96: 673-686 e Pedido Publicado U.S. 2002/0164730.

[00105] Em um aspecto, o pré-tratamento químico é preferivelmente realizado como um tratamento com ácido diluído e mais preferivelmente como um tratamento com ácido diluído contínuo. O ácido é tipicamente ácido sulfúrico, mas outros ácidos também podem ser usados, tais como ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloreto de hidrogênio ou misturas destes. O tratamento com ácido brando é conduzido na faixa de pH preferivelmente de 1 a 5, por exemplo, de 1 a 4 ou de 1 a 2,5. Em um aspecto, a concentração de ácido está preferivelmente na faixa de 0,01 a 10 % em peso de ácido, por exemplo, de 0,05 a 5 % em peso de ácido ou de 0,1 a 2 % em peso de ácido. O ácido é contatado com o refugo de cana de açúcar e mantido a uma temperatura na faixa de preferivelmente de 140 a 200°C e por exemplo, de 165 a 190°C, por períodos variando de 1 a 60 minutos.

[00106] Em um outro aspecto, o pré-tratamento ocorre em uma pasta fluida aquosa. Em aspectos preferidos, o refugo de cana de açúcar está presente durante o pré-tratamento em quantidades preferivelmente entre 10 e

80 % em peso, por exemplo, entre 20 e 70 % em peso ou entre 30 e 60 % em peso, tal como em torno de 40 % em peso. O refugo de cana de açúcar pré-tratado pode ser não lavado ou lavado usando qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, lavado com água.

[00107] Pré-tratamento Mecânico ou Pré-tratamento Físico: O termo “pré-tratamento mecânico” ou “pré-tratamento físico” refere-se a qualquer pré-tratamento que promova a redução do tamanho da partícula. Por exemplo tal pré-tratamento pode envolver vários tipos de trituração ou moagem (por exemplo, moagem a seco, moagem úmida ou moagem de bola vibratória).

[00108] O refugo da cana de açúcar pode ser pré-tratado both physically (mechanically) e chemically. Mechanical ou physical pré-tratamento pode ser ligado com steaming/steam explosion, hidrottermolysis, dilute ou mild ácido tratamento, high temperatura, high pressure tratamento, irradiação (por exemplo, microwave irradiação), ou combinações thereof. Em um aspecto, high pressure significa pressure in the faixa of preferivelmente cerca de 100 to cerca de 400 psi, por exemplo, cerca de 150 to cerca de 250 psi. Em um outro aspecto, high temperatura significa temperaturas in the faixa of cerca de 100 to cerca de 300°C, por exemplo, cerca de 140 to cerca de 200°C. Em um preferida aspecto, mechanical ou physical pré-tratamento é realizadas em um batch-process usando um steam gun hidrolisarr sistema that uses high pressure e high temperatura como definidos acima, por exemplo, um Sunds Hidrolisarr disponível from Sunds Defibrator AB, Sweden. The physical e química pré-tratamentos pode ser realizada sequentially ou simultânealy, como desired.

[00109] Consequentemente, em um aspecto preferido, o refugo de cana de açúcar é submetido ao pré-tratamento físico (mecânico), químico ou qualquer combinação destes para promover a separação e/ou liberação de celulose, hemicelulose e/ou lignina.

[00110] Pré-tratamento Biológico: O termo “pré-tratamento biológico”

refere-se a qualquer pré-tratamento biológico que promove a separação e/ou a liberação de celulose, hemicelulose, e/ou lignina a partir do refugo de cana de açúcar. As técnicas de pré-tratamento biológico podem envolver aplicar microrganismos e/ou enzimas que solubilizam lignina (ver, por exemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pré-treatment of biomass, no Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh e Singh, 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosical biomass: a review, em Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O. e Overend, R. P., eds., ACS Symposium Série 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J. e Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resource, em Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemanha, 65: 207-241; Olsson e Hahn-Hagerdal, 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; e Vallander e Eriksson, 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol. 42: 63-95).

[00111] Sacarificação. Na etapa da hidrólise, também conhecida como sacarificação, o refugo de cana de açúcar, por exemplo pré-tratado, é hidrolisado para romper a celulose e/ou a hemicelulose aos açúcares fermentáveis, tais como glicose, celobiose, xilose, xilulose, arabinose, manose, galactose e/ou oligossacarídeos solúveis. A hidrólise é realizada enzimaticamente por uma composição de enzima. As enzimas podem ser adicionadas simultânea ou sequencialmente.

[00112] A hidrólise enzimática é preferivelmente realizada em um ambiente aquoso adequado sob condições que podem ser facilmente

determinadas por uma pessoa habilitada na técnica. Em um aspecto, a hidrólise é realizada sob condições adequadas para a atividade da(s) enzima(s), isto é, ideal para a(s) enzima(s). A hidrólise pode ser realizada como um processo de lote alimentado ou contínuo onde o refugo de cana de açúcar pré-tratado (substrato) é alimentado gradualmente, por exemplo, a uma solução de hidrólise contendo enzima.

[00113] A sacarificação é geralmente realizada em reatores ou fermentadores de tanque agitado sob condições de pH, temperatura e mistura controladas. As condições de tempo de processo, temperatura e pH adequadas podem ser facilmente determinadas por uma pessoa habilitada na técnica. Por exemplo, a sacarificação pode durar até 200 horas, mas é tipicamente realizada preferivelmente por cerca de 12 a cerca de 120 horas, por exemplo, de cerca de 16 a cerca de 72 horas ou de cerca de 24 a cerca de 48 horas. A temperatura está preferivelmente na faixa de cerca de 25°C a cerca de 70°C, por exemplo, de cerca de 30°C a cerca de 65°C, de cerca de 40°C a cerca de 60°C, de cerca de 50°C a cerca de 55°C. O pH está preferivelmente na faixa de cerca de 3 a cerca de 8, por exemplo, de cerca de 3,5 a cerca de 7, de cerca de 4 a cerca de 6, ou de cerca de 5 a cerca de 5,5. O teor de sólidos secos está preferivelmente na faixa de cerca de 5 a cerca de 50 % em peso, por exemplo, de cerca de 10 a cerca de 40 % em peso ou de cerca de 20 a cerca de 30 % em peso.

[00114] As quantidades ideais das enzimas dependem de vários fatores que incluem, mas não são limitados à mistura de enzimas celulolíticas e/ou hemicelulolíticas componentes, ao refugo de cana de açúcar, à concentração de substrato celulósico, ao(s) pré-tratamento(s) do refugo de cana de açúcar, temperatura, tempo, pH e inclusão de organismo fermentador (por exemplo, levedura para a Sacarificação e Fermentação Simultâneas).

[00115] Em um aspecto, uma quantidade eficaz de proteína de enzima celulolítica para refugo de cana de açúcar é de cerca de 0,5 a cerca de 50 mg,

preferivelmente de cerca de 0,5 a cerca de 40 mg, preferivelmente de cerca de 0,5 a cerca de 25 mg, preferivelmente de cerca de 0,75 a cerca de 20 mg, preferivelmente de cerca de 0,75 a cerca de 15 mg, ainda preferivelmente de de cerca de 0,5 a cerca de 10 mg e o mais preferivelmente de cerca de 2,5 a cerca de 10 mg por g do refugo de cana de açúcar.

[00116] Em um outro aspecto, uma quantidade eficaz de um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica para refugo de cana de açúcar é de cerca de 0,01 a cerca de 50,0 mg, preferivelmente de cerca de 0,01 a cerca de 40 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,01 a cerca de 30 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,01 a cerca de 20 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,01 a cerca de 10 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,01 a cerca de 5 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,025 a cerca de 1,5 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,05 a cerca de 1,25 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,075 a cerca de 1,25 mg, mais preferivelmente de cerca de 0,1 a cerca de 1,25 mg, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,15 a cerca de 1,25 mg, e o mais preferivelmente de cerca de 0,25 a cerca de 1,0 mg por g do refugo de cana de açúcar.

[00117] Em um outro aspecto, uma quantidade eficaz de um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica para proteína de enzima celulolítica é de cerca de 0,005 a cerca de 1,0 g, preferivelmente de cerca de 0,01 a cerca de 1,0 g, mais preferivelmente de cerca de 0,15 a cerca de 0,75 g, mais preferivelmente de cerca de 0,15 a cerca de 0,5 g, mais preferivelmente de cerca de 0,1 a cerca de 0,5 g, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,1 a cerca de 0,5 g e o mais preferivelmente de cerca de 0,05 a cerca de 0,2 g por g de proteína de enzima celulolítica.

[00118] Fermentação. Os açúcares fermentáveis obtidos a partir do refugo de cana de açúcar hidrolisado podem ser fermentados por um ou mais (por exemplo, vários) microrganismos fermentadores capazes de fermentar os açúcares direta ou indiretamente em um produto de fermentação desejado.

“Fermentação” ou “processo de fermentação” referem-se a qualquer processo de fermentação ou qualquer processo que compreenda uma etapa de fermentação. Os processos de fermentação também incluem processos de fermentação usados na industrial de álcool consumível (por exemplo, cerveja e vinho), indústria de laticínios (por exemplo, produtos lácteos fermentados), indústria do couro e indústria do tabaco. As condições de fermentação dependem do produto de fermentação desejado e do organismo fermentador e podem ser facilmente determinadas por uma pessoa habilitada na técnica.

[00119] Na etapa de fermentação, açúcares, liberados do refugo de cana de açúcar como um resultado das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, são fermentados a um produto, por exemplo, etanol, por um organismo fermentador, tal como levedura. A hidrólise (sacarificação) e a fermentação podem ser separadas ou simultâneas, como aqui descrito.

[00120] O termo “meio de fermentação” é aqui entendido referir-se a um meio antes do(s) microrganismo(s) fermentador(es) ser(serem) adicionado(s), tal como, um meio resultante de um processo de sacarificação, assim como um meio usado em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

[00121] “Microrganismo fermentador” refere-se a qualquer microrganismo, que inclui organismos bacterianos e fúngicos, adequados para o uso em um processo de fermentação desejado para produzir um produto de fermentação. O organismo fermentador pode ser organismos fermentadores de hexose e/ou pentose ou uma combinação destes. Tanto o organismo fermentador de hexose quanto o de pentose são bem conhecidos na técnica. Os microrganismos fermentadores adequados são capazes de fermentar, isto é, converter, açúcares, tais como glicose, xilose, xilulose, arabinose, maltose, manose, galactose e/ou oligossacarídeos, direta ou indiretamente no produto de fermentação desejado.

[00122] Os exemplos de organismos fermentadores bacterianos e

fúngicos que produzem etanol são descritos por Lin *et al.*, 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

[00123] Os exemplos de microrganismos fermentadores que podem fermentar açúcares de hexose incluem organismos bacterianos e fúngicos, tais como levedura. As leveduras preferidas incluem cepas de *Candida*, *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*, por exemplo, *Candida sonorensis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

[00124] Os exemplos de organismos fermentadores que podem fermentar açúcares de pentose no seu estado nativo incluem organismos bacterianos e fúngicos, tais como algumas leveduras. As leveduras de fermentação de xilose preferidas incluem cepas de *Candida*, preferivelmente *C. sheatae* ou *C. sonorensis*; e cepas de *Pichia*, preferivelmente *P. stipitis*, tais como *P. stipitis* CBS 5773. As leveduras de fermentação de pentose preferidas incluem cepas de *Pachysolen*, preferivelmente *P. tannophilus*. Organismos não capazes de fermentar açúcares de pentose, tais como xilose e arabinose, podem ser geneticamente modificadas para assim fazê-lo pelos métodos conhecidos na técnica.

[00125] Os exemplos de bactérias que podem eficientemente fermentar hexose e pentose para etanol incluem, por exemplo, *Bacillus coagulans*, *Clostridium acetobutanicum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium phytofermentans*, *Geobacillus* sp., *Thermoanaerobacter saccharolyticum* e *Zymomonas mobilis* (Philippidis, 1996, *supra*).

[00126] Outros organismos de fermentação incluem cepas de *Bacillus*, tais como *Bacillus coagulans*; *Candida*, tais como *C. sonorensis*, *C. metanosorbosa*, *C. diddensiae*, *C. parapsilosis*, *C. naedodendra*, *C. blankii*, *C. entomophila*, *C. brassicae*, *C. pseudotropicalis*, *C. boidinii*, *C. utilis* e *C. scheidtiae*; *Clostridium*, tais como *C. acetobutanicum*, *C. thermocellum* e *C. phytofermentans*; *E. coli*, especialmente cepas de *E. coli* que foram geneticamente modificadas para melhorar o rendimento de etanol;

*Geobacillus* sp.; *Hansenula*, tais como *Hansenula anomala*; *Klebsiella*, tais como *K. oxitoca*; *Kluyveromyces*, tais como *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans* e *K. fragilis*; *Schizosaccharomyces*, tais como *S. pombe*; *Thermoanaerobacter*, tais como *Thermoanaerobacter saccharolyticum*; e *Zymomonas*, tais como *Zymomonas mobilis*.

[00127] Em um aspecto preferido, a levedura é uma *Bretannomyces*. Em um aspecto mais preferido, a levedura é *Bretannomyces clausenii*. Em um outro aspecto preferido, a levedura é uma *Candida*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida sonorensis*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida boidinii*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida blankii*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida brassicae*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida diddensii*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida entomophiliia*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida pseudotropicalis*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida scehatae*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida utilis*. Em um outro aspecto preferido, a levedura é uma *Clavispora*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Clavispora lusitaniae*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Clavispora opuntiae*. Em um outro aspecto preferido, a levedura é uma *Kluyveromyces*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Kluyveromyces fragilis*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Kluyveromyces marxianus*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Kluyveromyces thermotolerans*. Em um outro aspecto preferido, a levedura é um *Pachysolen*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Pachysolen tannophilus*. Em um outro aspecto preferido, a levedura é uma *Pichia*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é uma *Pichia stipitis*. Em um outro aspecto preferido, a levedura é uma *Saccharomyces* spp. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Saccharomyces cerevisiae*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é

*Saccharomyces distaticus*. Em um outro aspecto mais preferido, a levedura é *Saccharomyces uvarum*.

[00128] Em um aspecto preferido, a bactéria é um *Bacillus*. Em um aspecto mais preferido, a bactéria é *Bacillus coagulans*. Em um outro aspecto preferido, a bactéria é um *Clostridium*. Em um outro aspecto mais preferido, a bactéria é *Clostridium acetobutylicum*. Em um outro aspecto mais preferido, a bactéria é *Clostridium phytofermentans*. Em um outro aspecto mais preferido, a bactéria é *Clostridium thermocellum*. Em um outro aspecto mais preferido, a bactéria é *Geobacillus* sp. Em um outro aspecto mais preferido, a bactéria é um *Thermoanaerobacter*. Em um outro aspecto mais preferido, a bactéria é *Thermoanaerobacter saccharolyticum*. Em um outro aspecto preferido, a bactéria é um *Zymomonas*. Em um outro aspecto mais preferido, a bactéria é *Zymomonas mobilis*.

[00129] A levedura comercialmente disponível adequada para a produção de etanol inclui, por exemplo, BIOFERM<sup>®</sup> AFT e XR (NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, USA), levedura ETANOL RED<sup>®</sup> (Fermentis/Lesaffre, USA), FALI<sup>®</sup> (Fleischmann's Yeast, USA), FERMIOL<sup>®</sup> (DSM Specialties), GERT STRAND<sup>®</sup> (Gert Strand AB, Suécia) e SUPERSTART<sup>®</sup> e levedura fresca THERMOSACC<sup>®</sup> (Ethanol Technology, WI, USA).

[00130] Em um aspecto preferido, o microrganismo fermentador foi geneticamente modificado para fornecer a capacidade para fermentar açúcares de pentose, tais como xilose utilizando, arabinose utilizando e xilose e arabinose co-utilizando microrganismos.

[00131] A clonagem de genes heterólogos em vários fermentadores de microrganismo tem levado à construção de organismos capazes de converter hexoses e pentoses para etanol (co-fermentação) ((Chen e Ho, 1993, Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39-40: 135-147; Ho et

*al.*, 1998, Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1852-1859; Kotter and Ciriacy, 1993, Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 776-783; Walfridsson *et al.*, 1995, Xilose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4184-4190; Kuypers *et al.*, 2004, Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle, *FEMS Yeast Research* 4: 655-664; Beall *et al.*, 1991, Parametric studies of ethanol production from xilose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*, *Biotech. Bioeng.* 38: 296-303; Ingram *et al.*, 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, *Biotechnol. Bioeng.* 58: 204-214; Zhang *et al.*, 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, *Science* 267: 240-243; Deanda *et al.*, 1996, Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4465-4470; WO 2003/062430, xilose isomerase).

[00132] Em um aspecto preferido, o microrganismo fermentador geneticamente modificado é *Candida sonorensis*. Em um outro aspecto preferido, o microrganismo fermentador geneticamente modificado é *Escherichia coli*. Em um outro aspecto preferido, o microrganismo fermentador geneticamente modificado é *Klebsiella oxitoca*. Em um outro aspecto preferido, o microrganismo de fermentação geneticamente modificado é *Kluyveromyces marxianus*. Em um outro aspecto preferido, o microrganismo fermentador geneticamente modificado é *Saccharomyces cerevisiae*. Em um outro aspecto preferido, o microrganismo fermentador geneticamente modificado é *Zymomonas mobilis*.

[00133] É bem conhecido na técnica que os organismos descritos

acima também podem ser usados para produzir outras substâncias, como aqui descrito.

[00134] O microrganismo fermentador é tipicamente adicionado ao refugo de cana de açúcar degradado ou hidrolisado e a fermentação é realizada por cerca de 8 a cerca de 96 horas, por exemplo, de cerca de 24 a cerca de 60 horas. A temperatura está tipicamente entre cerca de 26°C a cerca de 60°C, por exemplo, de cerca de 32°C ou 50°C e de cerca do pH 3 a cerca do pH 8, por exemplo, pH 4 a 5, 6 ou 7.

[00135] Em um aspecto, a levedura e/ou um outro microrganismo são aplicados ao refugo de cana de açúcar degradado e a fermentação é realizada por cerca de 12 a cerca de 96 horas, tal como tipicamente de 24 a 60 horas. Em um outro aspecto, a temperatura está preferivelmente entre cerca de 20°C a cerca de 60°C, por exemplo, de cerca de 25°C a cerca de 50°C, de cerca de 32°C a cerca de 50°C, ou de cerca de 32°C a cerca de 50°C e o pH é geralmente de cerca do pH 3 a cerca do pH 7, por exemplo, em torno do pH 4 a cerca do pH 7. Entretanto, alguns organismos de fermentação, por exemplo, bactérias, têm temperatura de fermentação ideal mais alta. A levedura ou um outro microrganismo são preferivelmente aplicados em quantidades de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{12}$ , preferivelmente de aproximadamente  $10^7$  a  $10^{10}$ , especial e aproximadamente de  $2 \times 10^8$  contagens de célula viável por ml de caldo de fermentação. Orientação adicional com respeito ao uso da levedura para fermentação pode ser encontrada, por exemplo, em “The Alcohol Textbook” (Editores K. Jacques, T. P. Lyons e D. R. Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999), que é por meio deste incorporada por referência.

[00136] Um estimulador de fermentação pode ser usado em combinação com qualquer um dos processos aqui descritos para melhorar ainda mais o processo de fermentação e em particular, o desempenho do microrganismo fermentador, tal como, a taxa de realce e o rendimento de

etanol. Um “estimulador de fermentação” refere-se a estimuladores para o crescimento dos microrganismos fermentadores, em particular, levedura. Os estimuladores de fermentação preferidos para o crescimento incluem vitaminas e minerais. Os exemplos de vitaminas incluem multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzóico, ácido fólico, riboflavina e Vitaminas A, B, C, D e E. Ver, por exemplo, Alfenore *et al.*, Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002), que é por meio deste incorporada por referência. Os exemplos de minerais incluem minerais e sais minerais que podem fornecer nutrientes que compreendem P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn e Cu.

[00137] Produtos de fermentação: Um produto de fermentação pode ser qualquer substância derivada da fermentação. O produto de fermentação pode ser, sem limitação, um álcool (por exemplo, arabinol, n-butanol, isobutanol, etanol, glicerol, metanol, etileno glicol, 1,3-propanodiol [propileno glicol], butanodiol, glicerina, sorbitol e xilitol); um alcano (por exemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano e dodecano), um cicloalcano (por exemplo, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano e ciclooctano), um alqueno (por exemplo penteno, hexeno, hepteno e octeno); um aminoácido (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, lisina, serina e treonina); um gás (por exemplo, metano, hidrogênio (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e monóxido de carbono (CO)); isopreno; uma cetona (por exemplo, acetona); um ácido orgânico (por exemplo, ácido acético, ácido acetônico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glicônico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glicônico, ácido glicurônico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxiopropiônico, ácido itacônico, ácido láctico, ácido málico, ácido malônico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiônico, ácido succínico e ácido xilônico); e

policetídeo. O produto de fermentação também pode ser proteína como um produto de alto valor.

[00138] Em um aspecto preferido, o produto de fermentação é um álcool. Deve ser entendido que o termo “álcool” abrange uma substância que contém uma ou mais porções de hidroxila. Em um aspecto mais preferido, o álcool é n-butanol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é isobutanol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é etanol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é metanol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é arabinitol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é butanodiol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é etileno glicol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é glicerina. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é glicerol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é 1,3-propanodiol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é sorbitol. Em um outro aspecto mais preferido, o álcool é xilitol. Ver, por exemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., e Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, em *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemanha, 65: 207-241; Silveira, M. M., e Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., e Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. e Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in situ* recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.

[00139] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um alceno. O alceno pode ser um alceno não ramificado ou um ramificado. Em um outro aspecto mais preferido, o alceno é penteno. Em um outro aspecto mais preferido, o alceno é hexeno. Em um outro aspecto mais preferido, o alceno é hepteno. Em um outro aspecto mais preferido, o alceno é

octano. Em um outro aspecto mais preferido, o alcano é nonano. Em um outro aspecto mais preferido, o alcano é decano. Em um outro aspecto mais preferido, o alcano é undecano. Em um outro aspecto mais preferido, o alcano é dodecano.

[00140] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um cicloalcano. Em um outro aspecto mais preferido, o cicloalcano é ciclopentano. Em um outro aspecto mais preferido, o cicloalcano é ciclohexano. Em um outro aspecto mais preferido, o cicloalcano é cicloheptano. Em um outro aspecto mais preferido, o cicloalcano é ciclooctano.

[00141] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um alqueno. O alqueno pode ser um alqueno não ramificado ou um ramificado. Em um outro aspecto mais preferido, o alqueno é penteno. Em um outro aspecto mais preferido, o alqueno é hexeno. Em um outro aspecto mais preferido, o alqueno é hepteno. Em um outro aspecto mais preferido, o alqueno é octeno.

[00142] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um aminoácido. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido aspártico. Em um outro aspecto mais preferido, o aminoácido é o ácido glutâmico. Em um outro aspecto mais preferido, o aminoácido é glicina. Em um outro aspecto mais preferido, o aminoácido é lisina. Em um outro aspecto mais preferido, o aminoácido é serina. Em um outro aspecto mais preferido, o aminoácido é treonina. Ver, por exemplo, Richard, A. e Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poli(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 501-515.

[00143] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um gás. Em um outro aspecto mais preferido, o gás é metano. Em um outro aspecto mais preferido, o gás é H<sub>2</sub>. Em um outro aspecto mais preferido, o gás

é CO<sub>2</sub>. Em um outro aspecto mais preferido, o gás é CO. Ver, por exemplo, Kataoka, N., A. Miya e K. Kiriya, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, Water Science and Technology 36 (6-7): 41-47; e Gunaseelan V.N. em Biomass and Bioenergy, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.

[00144] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é isopreno.

[00145] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é uma cetona. Será entendido que o termo “cetona” abrange uma substância que contém uma ou mais porções de cetona. Em um outro aspecto mais preferido, a cetona é acetona. Ver, por exemplo, Qureshi e Blaschek, 2003, *supra*.

[00146] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um ácido orgânico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido acético. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido acetônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido adípico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido ascórbico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido cítrico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido 2,5-diceto-D-glicônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido fórmico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido fumárico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido glucárico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido glicônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido glicurônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido glutárico. Em um outro aspecto preferido, o ácido orgânico é o ácido 3-hidroxipropiônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido itacônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido láctico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido

málico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido malônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido oxálico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido propiônico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido succínico. Em um outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é o ácido xilônico. Ver, por exemplo, Chen, R. e Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65: 435-448.

[00147] Em um outro aspecto preferido, o produto de fermentação é policetídeo.

[00148] Recuperação. O(s) produto(s) de fermentação pode(m) ser opcionalmente recuperado(s) do meio de fermentação usando qualquer método conhecido na técnica que inclui, mas não é limitado a, cromatografia, procedimentos eletroforéticos, solubilidade diferencial, destilação ou extração. Por exemplo, o álcool é separado do refugo de cana de açúcar fermentado e purificado pelos métodos convencionais de destilação. O etanol com uma pureza de até cerca de 96 % em vol. pode ser obtido, que pode ser usado como, por exemplo, etanol combustível, etanol de beber, isto é, alcoóis neutros potáveis ou etanol industrial.

### **Composições de Enzima**

[00149] As composições de enzima podem compreender qualquer proteína que é útil na degradação ou converção de um refugo de cana de açúcar.

[00150] Em um aspecto, a composição de enzima compreende ou compreende adicionalmente uma ou mais (por exemplo, várias) proteínas selecionadas do grupo que consiste de uma celulase, um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica, uma hemicelulase, uma esterase, uma expansina, uma lacase, uma enzima ligninolítica, uma pectinase, uma peroxidase, uma protease, e uma suolenina. Em um outro aspecto, a celulase é

preferivelmente uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma endoglicanase, uma celobioidrolase, e uma beta-glicosidase. Em um outro aspecto, a hemicelulase é preferivelmente uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma acetilmanana esterase, uma acetilxilano esterase, uma arabinanase, uma arabinofuranosidase, uma ácido coumárico esterase, uma feruloil esterase, uma galactosidase, uma glicuronidase, uma glucuronoil esterase, uma mananase, uma manosidase, uma xilanase, e uma xilosidase.

[00151] Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas celulolíticas. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende ou compreende adicionalmente uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas hemicelulolíticas. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas celulolítica e uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas hemicelulolíticas. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas selecionadas do grupo de enzimas celulolíticas e enzimas hemicelulolíticas. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglicanase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma celobioidrolase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma beta-glicosidase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglucanase e um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma celobioidrolase e um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma beta-glicosidase e um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglicanase e uma celobioidrolase. Em um outro

aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglicanase e uma beta-glicosidase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma celobioidrolase e uma beta-glicosidase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglicanase, uma celobioidrolase, e um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglicanase, uma beta-glicosidase, e um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma celobioidrolase, uma beta-glicosidase, e um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglicanase, uma celobioidrolase, e uma beta-glicosidase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma endoglicanase, uma celobioidrolase, uma beta-glicosidase e um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica.

[00152] Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma acetilmanana esterase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma acetilxilano esterase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma arabinanase (por exemplo, alfa- L-arabinanase). Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma arabinofuranosidase (por exemplo, alfa- L-arabinofuranosidase). Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma ácido coumárico esterase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma feruloil esterase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma galactosidase (por exemplo, alfa- galactosidase e/ou beta-galactosidase). Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma glicuronidase (por exemplo, alfa- D-glicuronidase). Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma glicuronoil esterase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma mananase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma manosidase (por exemplo, beta-

manosidase). Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma xilanase. Em um aspecto preferido, a xilanase é uma xilanase da Família 10. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma xilosidase (por exemplo, beta-xilosidase).

[00153] Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma esterase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma expansina. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma lacase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma enzima ligninolítica. Em um aspecto preferido, a enzima ligninolítica é uma manganês peroxidase. Em um outro aspecto preferido, a enzima ligninolítica é uma lignina peroxidase. Em um outro aspecto preferido, a enzima ligninolítica é uma enzima que produz  $H_2O_2$ . Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma pectinase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma peroxidase. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma protease. Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma suolenina.

[00154] Nos métodos da presente invenção, a(s) enzima(s) pode(m) ser adicionadas antes ou durante a sacarificação, sacarificação e fermentação ou fermentação.

[00155] Um ou mais (por exemplo, vários) componentes da composição de enzima podem ser proteínas do tipo selvagem, proteínas recombinantes, ou uma combinação de proteínas do tipo selvagem e proteínas recombinantes. Por exemplo, um ou mais (por exemplo, vários) componentes podem ser proteínas nativas de uma célula, que é usada como uma célula hospedeira para expressar recombinantemente um ou mais (por exemplo, vários) outros componentes da composição de enzima. Um ou mais (por exemplo, vários) componentes da composição de enzima podem ser produzidos como monocomponentes, que são depois combinados para formar a composição de enzima. A composição de enzima pode ser uma combinação

de preparações de proteína de multicomponente e monocomponente.

[00156] As enzimas usadas nos métodos da presente invenção podem estar em qualquer forma adequada para o uso, tais como, por exemplo, uma formulação de caldo de fermentação ou uma composição de célula, um lisado de célula com ou sem fragmentos celulares, uma preparação de enzima semi-purificada ou purificada, ou uma célula hospedeira como uma fonte das enzimas. A composição de enzima pode ser um pó seco ou granulado, um granulado não empoável, um líquido, um líquido estabilizado, ou uma enzima protegida estabilizada. As preparações de enzima líquida, por exemplo, pode ser estabilizada pela adição de estabilizadores tais como um açúcar, um álcool de açúcar ou outro poliol, e/ou ácido láctico ou um outro ácido orgânico de acordo com processos estabelecidos.

[00157] Os polipeptídeos que tem atividade de enzima celulolítica ou atividade de enzima hemicelulolítica assim como outras proteínas/polipeptídeos úteis na degradação do material celulósico, por exemplo, polipeptídeos GH61 que tem atividade realçadora celulolítica (coletivamente daqui em diante “polipeptídeos que tem atividade de enzima”) podem ser derivadas ou obtidas a partir de qualquer origem adequada, incluindo, a origem bacteriana, fúngica, de levedura, vegetal, ou mamífera. O termo “obtido” também significa aqui que a enzima pode ter sido produzida recombinantemente em um organismo hospedeiro utilizando métodos aqui descritos, em que a enzima recombinantemente produzida é nativa ou estranha para o organismo hospedeiro ou tem uma sequência de aminoácido modificada, por exemplo, tendo um ou mais (por exemplo, vários) aminoácidos que são deletados, inseridos e/ou substituídos, isto é, uma enzima recombinantemente produzida que é um mutante e/ou um fragmento de uma sequência de aminoácido nativa ou uma enzima produzida pelos processos de embaralhamento de ácido nucleico conhecidos na técnica. Abrangidos dentro do significado de uma enzima nativa estão variantes

naturais e dentro do significado de uma enzima estranha estão variantes obtidas recombinantemente, tal como pela mutagênese loco dirigida ou embaralhamento.

[00158] Um polipeptídeo tendo atividade de enzima pode ser um polipeptídeo bacteriano. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo bacteriano gram positivo tal como um polipeptídeo de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphilococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, *Caldicellulosiruptor*, *Acidothermus*, *Thermobifidia* ou *Oceanobacillus* tendo atividade de enzima, ou um polipeptídeo bacteriano Gram negativo tal como um polipeptídeo de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campilobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, ou *Ureaplasma* tendo atividade de enzima.

[00159] Em um aspecto, o polipeptídeo é um *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, ou *Bacillus thuringiensis* polipeptídeo GH61 tendo atividade de enzima.

[00160] Em um outro aspecto, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, ou *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* tendo atividade de enzima.

[00161] Em um outro aspecto, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, ou *Streptomyces lividans* tendo atividade de enzima.

[00162] O polipeptídeo tendo atividade de enzima também pode ser um polipeptídeo fúngico, e mais preferivelmente um polipeptídeo de levedura tal como um polipeptídeo de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*,

*Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia* tendo atividade de enzima; ou mais preferivelmente um polipeptídeo de fungo filamentoso tal como um polipeptídeo de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophillum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, ou *Xilaria* tendo atividade de enzima.

[00163] Em um aspecto, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, ou *Saccharomyces oviformis* tendo atividade de enzima.

[00164] Em um outro preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Acremonium celulolíticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium*

*sarcochrom*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, ou *Trichophaea saccata* tendo atividade de enzima.

[00165] Os mutantes quimicamente modificados ou engendrados de proteína de polipeptídeos tendo atividade de enzima também podem ser usados.

[00166] Um ou mais (por exemplo, vários) componentes da composição de enzima podem ser um componente recombinante, isto é, produzidos pela clonagem de uma sequência de DNA que codifica o componente único e célula subsequente transformada com a sequência de DNA e expressada em um hospedeiro (ver, por exemplo, a WO 91/17243 e WO 91/17244). O hospedeiro é preferivelmente um hospedeiro heterólogo (a enzima é estranha ao hospedeiro), mas o hospedeiro pode sob certas condições ser também um hospedeiro homólogo (a enzima é nativa ao hospedeiro). As proteínas celulolíticas de monocomponente também podem ser preparadas pela purificação de uma tal proteína a partir de um caldo de fermentação.

[00167] Em um aspecto, a um ou mais (por exemplo, várias) enzimas celulolíticas compreendem uma preparação de enzima celulolítica comercial. Os exemplos de preparações de enzima celulolítica comercial adequados para o uso na presente invenção incluem, por exemplo, CELLIC<sup>®</sup> CTec

(Novozymes A/S), CELLIC<sup>®</sup> CTec (Novozymes A/S), CELLUCLAST<sup>®</sup> (Novozymes A/S), NOVOZYM<sup>®</sup> 188 (Novozymes A/S), CELLUZYME<sup>®</sup> (Novozymes A/S), CEREFLO<sup>®</sup> (Novozymes A/S), e ULTRAFLO<sup>®</sup> (Novozymes A/S), ACCELERASE<sup>®</sup> (Genencor Int.), LAMINEX<sup>®</sup> (Genencor Int.), SPEZYME<sup>®</sup> CP (Genencor Int.), FILTRASE<sup>®</sup> NL (DMS); METHAPLUS<sup>®</sup> S/L 100 (DSM), ROHAMENT<sup>®</sup> 7069 W (Röhm GmbH), FIBREZYME<sup>®</sup> LDI (Dyadic International, Inc.), FIBREZYME<sup>®</sup> LBR (Dyadic International, Inc.), ou VISCOSTAR<sup>®</sup> 150L (Dyadic International, Inc.). As enzimas de celulase são adicionadas em quantidades eficazes de cerca de 0,001 a cerca de 5,0 % em peso de sólidos, por exemplo, de cerca de 0,025 a cerca de 4,0 % em peso de sólidos ou de cerca de 0,005 a cerca de 2,0 % em peso de sólidos.

[00168] Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma preparação de celulase de *Trichoderma reesei* que contém proteína de fusão da beta-glucosidase de *Aspergillus oryzae* (WO 2008/057637) e polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* (WO 2005/074656). Em um outro aspecto, a composição de enzima compreende uma mistura de uma xilanase GH10 de *Aspergillus aculeatus* (WO 94/021785) e uma preparação de celulase de *Trichoderma reesei* que contém beta-glucosidase de *Aspergillus fumigatus* (WO 2005/047499) e polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* (WO 2005/074656).

[00169] Os exemplos de endoglicanases bacterianas que podem ser usadas nos métodos da presente invenção, incluem, mas não são limitadas a, uma endoglicanase de *Acidothermus celulolíticus* (WO 91/05039; WO 93/15186; Patente U.S. Nº 5.275.944; WO 96/02551; Patente U.S. Nº 5.536.655, WO 00/70031, WO 05/093050); endoglicanase III de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050); e endoglicanase V de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050).

[00170] Os exemplos de endoglicanases fúngicas que podem ser

usadas na presente invenção, incluem, mas não são limitados a, uma endoglicanase I de *Trichoderma reesei* (Penttila *et al.*, 1986, Gene 45: 253-263; endoglicanase I Cel7B de *Trichoderma reesei*; acesso no GENBANK<sup>®</sup> nº M15665; SEQ ID NO: 2); endoglicanase II de *Trichoderma reesei* (Saloheimo, *et al.*, 1988, Gene 63: 11-22; endoglicanase I Cel5A de *Trichoderma reesei*; acesso no GENBANK<sup>®</sup> nº M19373; SEQ ID NO: 4); endoglicanase III de *Trichoderma reesei* (Okada *et al.*, 1988, Appl. Environ. Microbiol. 64: 555-563; acesso no GENBANK<sup>®</sup> no. AB003694; SEQ ID NO: 6); endoglicanase V de *Trichoderma reesei* (Saloheimo *et al.*, 1994, Molecular Microbiology 13: 219-228; acesso no GENBANK<sup>®</sup> no. Z33381; SEQ ID NO: 8); endoglicanase de *Aspergillus aculeatus* (Ooi *et al.*, 1990, Nucleic Acids Research 18: 5884); endoglicanase de *Aspergillus kawachii* (Sakamoto *et al.*, 1995, Current Genetics 27: 435-439); endoglicanase de *Erwinia carotovora* (Saarilahti *et al.*, 1990, Gene 90: 9-14); endoglicanase de *Fusarium oxysporum* (acesso no GENBANK<sup>®</sup> no. L29381); endoglicanase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (acesso no GENBANK<sup>®</sup> no. AB003107); endoglicanase de *Melanocarpus albomyces* (acesso no GENBANK<sup>®</sup> no. MAL515703); endoglicanase de *Neurospora crassa* (acesso no GENBANK<sup>®</sup> no. XM\_324477); endoglicanase V de *Humicola insolens* (SEQ ID NO: 10); endoglicanase *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65 (SEQ ID NO: 12); endoglicanase de basidiomicete CBS 495.95 (SEQ ID NO: 14); endoglicanase de basidiomicete CBS 494.95 (SEQ ID NO: 16); endoglicanase de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6B (SEQ ID NO: 18); endoglicanase de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6C (SEQ ID NO: 20); endoglicanase de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7C (SEQ ID NO: 22); endoglicanase de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7E (SEQ ID NO: 24); endoglicanase de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7F (SEQ ID NO: 26); endoglicanase de *Cladorrhinum foecundissimum* ATCC 62373 CEL7A (SEQ ID NO: 28); e endoglicanase de *Trichoderma reesei* cepa No. VTT-D-80133 (SEQ ID NO:

30; acesso no GENBANK<sup>®</sup> no. M15665). As endoglicanases da SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, e SEQ ID NO: 30, descritas acima são codificadas pela sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, e SEQ ID NO: 29, respectivamente.

[00171] Os exemplos de celobioidrolases úteis na presente invenção incluem, mas não são limitados a, celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 32); celobioidrolase II de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 34); celobioidrolase I de *Humicola insolens* (SEQ ID NO: 36); celobioidrolase II de *Myceliophthora thermophila* (SEQ ID NO: 38 e SEQ ID NO: 40); celobioidrolase II de *Thielavia terrestris* (CEL6A) (SEQ ID NO: 42); celobioidrolase I de *Chaetomium thermophiluma* (SEQ ID NO: 44); e celobioidrolase II de *Chaetomium thermophiluma* (SEQ ID NO: 46), celobioidrolase I de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 48), e celobioidrolase II de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 50). As celobioidrolases da SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, e SEQ ID NO: 50, descritas acima são codificadas pela sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, e SEQ ID NO: 49, respectivamente.

[00172] Os exemplos de beta-glicosidases úteis na presente invenção incluem, mas não são limitados a, beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 52); beta-glicosidase de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO:

54); IBT 20888 beta-glicosidase de *Penicillium brasilianum* (SEQ ID NO: 56); beta-glicosidase de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 58); e beta-glicosidase de *Aspergillus aculeatus* (SEQ ID NO: 60). As beta-glicosidasas da SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, e SEQ ID NO: 60, descritas acima são codificadas pela sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, e SEQ ID NO: 59, respectivamente.

[00173] Os exemplos de outras beta-glicosidasas úteis na presente invenção incluem uma proteína de fusão variante da beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* da SEQ ID NO: 62 ou a proteína de fusão da beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* da SEQ ID NO: 64. As proteínas de fusão da beta-glicosidase da SEQ ID NO: 62 e SEQ ID NO: 64 são codificadas pelas SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 63, respectivamente.

[00174] A beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* pode ser obtida de acordo com a WO 2002/095014. A beta-glicosidase de *Aspergillus fumigatus* pode ser obtida de acordo com a WO 2005/047499. A beta-glicosidase de *Penicillium brasilianum* pode ser obtida de acordo com a WO 2007/019442. A beta-glicosidase de *Aspergillus niger* pode ser obtida de acordo com Dan *et al.*, 2000, J. Biol. Chem. 275: 4973-4980. A beta-glicosidase de *Aspergillus aculeatus* pode ser obtida de acordo com Kawaguchi *et al.*, 1996, Gene 173: 287-288.

[00175] Outras endoglicanases, celobioidrolases, e beta-glicosidasas úteis são divulgadas em numerosas famílias da Glicosil Hidrolase usando a classificação de acordo com Henrissat B., 1991, A classification of glycosil hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, e Henrissat B., e Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosil hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[00176] Outras enzimas celulolíticas que podem ser usadas na presente invenção são descritas na WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633,

WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, Patente U.S. Nº 5.457.046, Patente U.S. Nº 5.648.263, e Patente U.S. Nº 5.686.593.

[00177] Nos métodos da presente invenção, qualquer polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica pode ser usado.

[00178] Os exemplos de polipeptídeos GH61 que tem atividade realçadora celulolítica úteis nos métodos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, polipeptídeos GH61 de *Thielavia terrestris* (WO 2005/074647, WO 2008/148131 e WO 2011/035027), *Thermoascus aurantiacus* (WO 2005/074656 e WO 2010/065830), *Tricoderma reesei* (WO 2007/089290), *Myceliophthora thermophila* (WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868), *Aspergillus fumigatus* (WO 2010/138754), polipeptídeos GH61 de *Penicillium pinophilum* (WO 2011/005867), *Thermoascus* sp. (WO 2011/039319), *Penicillium* sp. (WO 2011/041397) e *Thermoascus crustaceus* (WO 2011/041504).

[00179] Em um primeiro aspecto, o polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica compreende os seguintes motivos:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ]  
(SEQ ID NO: 133 ou SEQ ID NO: 134) e [FW]-[TF]-K-[AIV],

em que X é qualquer aminoácido, X(4,5) é qualquer aminoácido at 4 ou 5 contiguos posições e X(4) é qualquer aminoácido at 4 contiguos posições.

[00180] O polipeptídeo isolado que compreende the os motifs acima pode compreender adicionalmente:

H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] (SEQ ID NO: 135 ou SEQ ID NO: 136),

[EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV] (SEQ ID NO: 137), ou

H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] (SEQ ID NO: 138 ou SEQ ID NO: 139) e [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV] (SEQ ID NO: 140),

[00181] em que X é qualquer aminoácido, X (1,2) é qualquer aminoácido em 1 posição ou 2 posições contíguas, X (3) é qualquer aminoácido em 3 posições contíguas, e X (2) é qualquer aminoácido em 2 posições contíguas. Nos motivos acima, a abreviação de aminoácido de letra única da IUPAC aceita é utilizada.

[00182] Em uma forma de realização preferida, o polipeptídeo GH61 isolado tendo atividade realçadora celulolítica compreende adicionalmente H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] (SEQ ID NO: 141 ou SEQ ID NO: 142). Em uma outra forma de realização preferida, o polipeptídeo isolado tendo atividade realçadora celulolítica compreende adicionalmente [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV] (SEQ ID NO: 143). Em uma outra forma de realização preferida, o polipeptídeo GH61 isolado tendo atividade realçadora celulolítica compreende adicionalmente H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] (SEQ ID NO: 144 ou SEQ ID NO: 145) e [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV] (SEQ ID NO: 146).

[00183] Em um segundo aspecto, os polipeptídeos isolados tendo atividade realçadora celulolítica compreendem o seguinte motivo:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(3)-A-[HNQ] (SEQ ID NO: 147 ou SEQ ID NO: 148),

[00184] em que X é qualquer aminoácido, X(4,5) é qualquer aminoácido em 4 ou 5 posições contíguas, e X(3) é qualquer aminoácido em 3 posições contíguas. No motivo acima, a abreviação de aminoácido de letra

única da IUPAC aceita é utilizada.

[00185] Em um terceiro aspecto, o polipeptídeo tendo atividade realçadora celulolítica compreende uma sequência de aminoácido que tem um grau de identidade de sequência para o polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, ou SEQ ID NO: 128 de pelo menos 60 %, por exemplo, pelo menos 65 %, pelo menos 70 %, pelo menos 75 %, pelo menos 80 %, pelo menos 85 %, pelo menos 90 %, pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, ou pelo menos 95 %, pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 %, ou pelo menos 100 %.

[00186] Em um quarto aspecto, o polipeptídeo tendo atividade realçadora celulolítica é codificado por um polinucleotídeo que hibridiza sob pelo menos condições de severidade muito baixa, preferivelmente pelo menos condições de severidade baixa, mais preferivelmente pelo menos condições de severidade média, mais preferivelmente pelo menos condições de severidade média alta, ainda mais preferivelmente pelo menos condições de severidade alta, e o mais preferivelmente pelo menos condições de severidade muito alta com (i) a sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO:

109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, ou SEQ ID NO: 127, (ii) a sequência de cDNA da sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, ou SEQ ID NO: 79, ou a sequência de DNA genômico que compreende a sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, ou SEQ ID NO: 127, (iii) uma subsequência de (i) ou (ii), ou (iv) o complemento de tamanho natural de (i), (ii), ou (iii) (Sambrook, *et al* 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor, New York). Uma subsequência da sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, ou SEQ ID NO: 127 contém pelo menos 100 nucleotídeos contíguos ou preferivelmente de pelo menos 200 nucleotídeos contíguos. Além disso, a subsequência pode codificar um fragmento de polipeptídeo que tem atividade realçadora celulolítica.

[00187] Em um quinto aspecto, o polipeptídeo tendo atividade realçadora celulolítica é codificado por um polinucleotídeo que compreende

ou consiste de uma sequência de nucleotídeo que tem um grau de identidade de sequência com a sequência codificadora do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, ou SEQ ID NO: 127 de preferivelmente pelo menos 60 %, mais preferivelmente pelo menos 65 %, mais preferivelmente pelo menos 70 %, mais preferivelmente pelo menos 75 %, mais preferivelmente pelo menos 80 %, mais preferivelmente pelo menos 85 %, ainda mais preferivelmente pelo menos 90 %, o mais preferivelmente de pelo menos 91 %, pelo menos 92 %, pelo menos 93 %, pelo menos 94 %, ou pelo menos 95 %, e ainda o mais preferivelmente de pelo menos 96 %, pelo menos 97 %, pelo menos 98 %, pelo menos 99 %, ou pelo menos 100 %.

[00188] Em um sexto aspecto, o polipeptídeo tendo atividade realçadora celulolítica é uma variante artificial que compreende uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais (ou vários) aminoácidos do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, ou SEQ ID NO: 128; ou uma sequência homóloga destas.

[00189] Em uma forma de realização, o número de substituições, deleções e/ou inserções de aminoácido introduzidas no polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 2 é até 10, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10. As mudanças de aminoácido podem ser de uma natureza menor, isto é substituições ou inserções de aminoácido conservativas que não afetam significativamente a dobra e/ou atividade da proteína; deleções pequenas, tipicamente de 1 a 30 aminoácidos; extensões pequenas de terminal amino ou carboxila, tal como um resíduo de metionina de terminal amino; um peptídeo ligador pequeno de até 20 a 25 resíduos; ou uma extensão pequena que facilita a purificação pela mudança da carga líquida ou uma outra função, tal como um trato de poli-histidina, um epítipo antigênico ou um domínio de ligação.

[00190] Os exemplos de substituições conservativas estão dentro dos grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina), e aminoácidos pequenos (glicina, alanina, serina, treonina e metionina). As substituições de aminoácido que no geral não alteram a atividade específica são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, por H. Neurath e R. L. Hill, 1979, Em, *The Proteins*, Academic Press, Nova Iorque. As substituições comuns que ocorrem mais habitualmente são Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, e Asp/Gly.

[00191] Alternativamente, as mudanças de aminoácido são de uma tal natureza que as propriedades físico-químicas dos polipeptídeos são alteradas. Por exemplo, as mudanças de aminoácido podem melhorar a estabilidade térmica do polipeptídeo, alterar a especificidade de substrato, mudar o pH ideal, e os seus semelhantes.

[00192] Os aminoácidos essenciais em um polipeptídeo podem ser identificados de acordo com procedimentos conhecidos na técnica, tais como mutagênese loco dirigida ou mutagênese de varredura de alanina (Cunningham e Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). Na última técnica, as mutações de alanina simples são introduzidas em cada resíduo na molécula, e as moléculas mutantes resultantes são testadas quanto a atividade da enzima para identificar resíduos de aminoácido que são críticos para a atividade da molécula. Ver também, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. O sítio ativo da enzima ou outra interação biológica também podem ser determinados pela análise física da estrutura, como determinada por técnicas tais como ressonância magnética nuclear, cristalografia, difração de elétron, ou rotulação de fotoafinidade, em conjunção com a mutação de aminoácidos de sítio de contato putativo. Ver, por exemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. A identidade de aminoácidos essenciais também podem ser deduzidas de um alinhamento com um polipeptídeo relacionado.

[00193] As substituições, deleções, e/ou inserções de aminoácido simples ou múltiplas podem ser feitas e testadas usando métodos conhecidos de mutagênese, recombinação, e/ou embaralhamento, seguido por um procedimento de triagem relevante, tal como aquela divulgada por Reidhaar-Olson e Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie e Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; ou WO 95/22625. Outros métodos que podem ser usados incluem PCR propensa a erro, demonstração de fago (por exemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; Patente U.S. No 5.223.409; WO 92/06204), e mutagênese dirigida à região (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

[00194] Os métodos de mutagênese/embaralhamento podem ser combinados com métodos de triagem de alto rendimento, automatizados para

detectar a atividade de polipeptídeos clonados, mutagenizados expressados pelas células hospedeiras (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). As moléculas de DNA mutagenizadas que codificam polipeptídeos ativos podem ser recuperados a partir das células hospedeiras e rapidamente sequenciadas usando métodos padrão na técnica. Estes métodos permitem a determinação rápida da importância de resíduos de aminoácido individuais em um polipeptídeo.

[00195] O número total de substituições, deleções e/ou inserções de aminoácido do polipeptídeo maduro da SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, ou SEQ ID NO: 128 não é mais do que 4, por exemplo, 1, 2, 3, ou 4.

[00196] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica é usado na presença de um cátion de metal bivalente ativador solúvel de acordo com a WO 2008/151043, por exemplo, sulfato de manganês.

[00197] Em um outro aspecto preferido, o polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica é usado na presença de um composto de dióxido, um composto bicíclico, um composto heterocíclico, um composto que contém nitrogênio, um composto de quinona, um composto que contém enxofre, ou um líquido obtido a partir de um material celulósico pré-tratado tal como forragem de milho pré-tratada (PCS).

[00198] O composto de dióxido pode incluir qualquer composto adequado que contém dois ou mais átomos de oxigênio. Em alguns aspectos,

os compostos de dióxi contêm uma porção de arila substituída como aqui descrita. Os compostos de dióxi podem compreender um ou mais (por exemplo, vários) hidroxilas e/ou derivados de hidroxila, mas também incluem porções de arila substituídas que carecem de hidroxila e derivados de hidroxila. Os exemplos não limitantes dos compostos de dióxi incluem pirocatecol ou catecol; ácido caféico; ácido 3,4-diidroxi-benzóico; 4-terc-butil-5-metóxi-1,2-benzenodiol; pirogalol; ácido gálico; metil-3,4,5-triidroxibenzoato; 2,3,4-triidroxibenzofenona; 2,6-dimetoxifenol; ácido sinápico; ácido 3,5-diidroxi-benzóico; 4-cloro-1,2-benzenodiol; 4-nitro-1,2-benzenodiol; ácido tânico; galato de etila; glicolato de metila; ácido diidroxi-fumárico; 2-butino-1,4-diol; (ácido crocônico; 1,3-propanodiol; ácido tartárico; 2,4-pentanodiol; 3-etilóxi-1,2-propanodiol; 2,4,4'-triidroxibenzofenona; cis-2-buteno-1,4-diol; 3,4-diidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona; diidroxiacetona; acroleína acetal; metil-4-hidroxi-benzoato; ácido 4-hidroxi-benzóico; e metil-3,5-dimetóxi-4-hidroxi-benzoato; ou um sal ou solvato destes.

[00199] O composto bicíclico pode incluir qualquer sistema de anel fundido substituído adequado como aqui descrito. Os compostos podem compreender um ou mais (por exemplo, vários) anéis adicionais e não são limitados a um número específico de anéis a menos que de outro modo estabelecido. Em um aspecto, o composto bicíclico é um flavonóide. Em um outro aspecto, o composto bicíclico é um isoflavonóide opcionalmente substituído. Em um outro aspecto, o composto bicíclico é um íon flavílio opcionalmente substituído, tal como uma antocianidina opcionalmente substituída ou antocianina opcionalmente substituída, ou derivado desta. Os exemplos não limitantes dos compostos bicíclicos incluem epicatequina; quercetina; miricetina; taxifolina; caempferol; morina; acacetina; naringenina; isorramnetina; apigenina; cianidina; cianina; curomanina; queracianina; ou um sal ou solvato destes.

[00200] O composto heterocíclico pode ser qualquer composto adequado, tal como um anel aromático ou não aromático opcionalmente substituída que compreende um heteroátomo, como aqui descrito. Em um aspecto, o heterocíclico é um composto que compreende uma porção heterocicloalquila opcionalmente substituída ou uma porção heteroarila opcionalmente substituída. Em um outro aspecto, a porção heterocicloalquila opcionalmente substituída ou porção heteroarila opcionalmente substituída é uma porção de heterocicloalquila de 5 membros opcionalmente substituída ou uma heteroarila de 5 membros opcionalmente substituída. Em um outro aspecto, a porção heterocicloalquila opcionalmente substituída ou porção heteroarila opcionalmente substituída é uma porção opcionalmente substituída selecionada de pirazolila, furanila, imidazolila, isoxazolila, oxadiazolila, oxazolila, pirrolila, piridila, pirimidila, piridazinila, tiazolila, triazolila, tienila, diidrotieno-pirazolila, tianaftenila, carbazolila, benzimidazolila, benzotienila, benzofuranila, indolila, quinolinila, benzotriazolila, benzotiazolila, benzoaxazolila, benzimidazolila, isoquinolinila, isoindolila, acridinila, benzoisazolila, dimetilidantoína, pirazinila, tetraidrofuranila, pirrolinila, pirrolidinila, morfolinila, indolila, diazepinila, azepinila, tiepinila, piperidinila e oxepinila. Em um outro aspecto, a porção heterocicloalquila opcionalmente substituída ou porção heteroarila opcionalmente substituída é uma furanila opcionalmente substituída. Os exemplos não limitantes dos compostos heterocíclicos incluem (1,2-diidroxi-3,4-diidroxi)furano-2(5H)-ona; 4-hidróxi-5-metil-3-furanona; 5-hidróxi-2(5H)-furanona; [1,2-diidroxi-3,4-diidroxi]furano-2,3,4(5H)-triona;  $\alpha$ -hidróxi- $\gamma$ -butirolactona;  $\gamma$ -lactona ribônica; ácido aldexurônico  $\gamma$ -lactona; ácido glicônico  $\delta$ -lactona; 4-hidroxicoumarina; diidrobenzofurano; 5-(hidroximetil)furfural; furoína; 2(5H)-furanona; 5,6-diidro-2H-piran-2-ona; e 5,6-diidro-4-hidróxi-6-metil-2H-piran-2-ona; ou um sal ou solvato destes.

[00201] O composto que contém nitrogênio pode ser qualquer

composto adequado com um ou mais átomos de nitrogênio. Em um aspecto, o composto que contém nitrogênio compreende uma porção de amina, imina, hidroxilamina, ou nitróxido. Os exemplos não limitantes dos compostos que contêm nitrogênio incluem acetona oxima; ácido violúrico; piridino-2-aldoxima; 2-aminofenol; 1,2-benzenodiamina; 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilóxi; 5,6,7,8-tetraidrobiopterina; 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetraidropterina; e ácido maleâmico; ou um sal ou solvato destes.

[00202] O composto de quinona pode ser qualquer composto adequado que compreende uma porção de quinona como aqui descrita. Os exemplos não limitantes dos compostos de quinona incluem 1,4-benzoquinona; 1,4-naftoquinona; 2-hidróxi-1,4-naftoquinona; 2,3-dimetóxi-5-metil-1,4-benzoquinona ou coenzima Q0; 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzoquinona ou duroquinona; 1,4-diidroxiantraquinona; 3-hidróxi-1-metil-5,6-indolinodiona ou adrenocromo; 4-terc-butil-5-metóxi-1,2-benzoquinona; pirroloquinolina quinona; ou um sal ou solvato deste.

[00203] O composto que contém enxofre pode ser qualquer composto adequado que compreende um ou mais átomos de enxofre. Em um aspecto, o composto que contém enxofre compreende uma porção selecionada de tionila, tioéter, sulfinila, sulfonila, sulfamida, sulfonamida, ácido sulfônico e éster sulfônico. Os exemplos não limitantes dos compostos que contêm enxofre incluem etanotiol; 2-propanotiol; 2-propeno-1-tiol; ácido 2-mercaptoetanossulfônico; benzenotiol; benzeno-1,2-ditiol; cisteína; metionina; glutatona; cistina; ou um sal ou solvato destes.

[00204] Em um aspecto, uma quantidade eficaz de um tal composto descrito acima ao material celulósico como uma razão molar para unidades de glicosila de celulose é de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de 10, por exemplo, de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de 7,5, de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de 5, de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de 2,5, de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de 1, de cerca de  $10^{-5}$  a cerca de 1, de cerca de  $10^{-5}$  a cerca de  $10^{-1}$ , de cerca de  $10^{-4}$  a cerca de  $10^{-1}$ , de cerca de  $10^{-3}$  a

cerca de  $10^{-1}$ , ou cerca de  $10^{-3}$  a cerca de  $10^{-2}$ . Em um outro aspecto, uma quantidade eficaz de um tal composto descrito acima é de cerca de  $0,1 \mu\text{M}$  a cerca de  $1 \text{ M}$ , por exemplo, de cerca de  $0,5 \mu\text{M}$  a cerca de  $0,75 \text{ M}$ , de cerca de  $0,75 \mu\text{M}$  a cerca de  $0,5 \text{ M}$ , de cerca de  $1 \mu\text{M}$  a cerca de  $0,25 \text{ M}$ , de cerca de  $1 \mu\text{M}$  a cerca de  $0,1 \text{ M}$ , de cerca de  $5 \mu\text{M}$  a cerca de  $50 \text{ mM}$ , de cerca de  $10 \mu\text{M}$  a cerca de  $25 \text{ mM}$ , de cerca de  $50 \mu\text{M}$  a cerca de  $25 \text{ mM}$ , de cerca de  $10 \mu\text{M}$  a cerca de  $10 \text{ mM}$ , de cerca de  $5 \mu\text{M}$  a cerca de  $5 \text{ mM}$ , ou cerca de  $0,1 \text{ mM}$  a cerca de  $1 \text{ mM}$ .

[00205] O termo “líquido” significa a fase de solução, aquosa, orgânica, ou uma combinação destas, que surgem do tratamento de um material de lignocelulose e/ou hemicelulose em uma pasta fluida, ou monossacarídeos destes, por exemplo, xilose, arabinose, manose, etc., sob condições como aqui descritas e os seus conteúdos solúveis. Um líquido para o realce celulolítico de um polipeptídeo GH61 pode ser produzido pelo tratamento de um material de lignocelulose ou hemicelulose (ou estoque de alimentação) pela aplicação de calor e/ou pressão, opcionalmente na presença de um catalisador, por exemplo, ácido, opcionalmente na presença de um solvente orgânico e opcionalmente em combinação com rompimento físico do material e depois separando a solução dos sólidos residuais. Tais condições determinam o grau de realce celulolítico obtenível através da combinação de líquido e um polipeptídeo GH61 durante a hidrólise de um substrato celulósico por uma preparação de celulase. O líquido pode ser separado do material tratado usando um método padrão na técnica, tal como filtração, sedimentação, ou centrifugação.

[00206] Em um aspecto, uma quantidade eficaz do líquido para celulose é de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de  $10 \text{ g}$  por grama de celulose, por exemplo, de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de  $7,5 \text{ g}$ , de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de  $5$ , de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de  $2,5 \text{ g}$ , de cerca de  $10^{-6}$  a cerca de  $1 \text{ g}$ , de cerca de  $10^{-6}$

5 a cerca de 1 g, de cerca de 10<sup>-5</sup> a cerca de 10<sup>-1</sup> g, de cerca de 10<sup>-4</sup> a cerca de 10<sup>-1</sup> g, de cerca de 10<sup>-3</sup> a cerca de 10<sup>-1</sup> g, ou de cerca de 10<sup>-3</sup> a cerca de 10<sup>-2</sup> g por grama de celulose.

[00207] Em um aspecto, a uma ou mais (por exemplo, várias) enzimas hemicelulolíticas compreendem uma preparação de enzima hemicelulolítica comercial. Os exemplos de preparações de enzima hemicelulolítica comercial adequadas para o uso na presente invenção incluem, por exemplo, SHEARZIMA® (Novozymes A/S), CELLIC® HTec (Novozymes A/S), CELLIC® HTec2 (Novozymes A/S), VISCOZIMA® (Novozymes A/S), ULTRAFLO® (Novozymes A/S), PULPZIMA® HC (Novozymes A/S), MULTIFECT® Xilanase (Genencor), ACCELLERASE® XY (Genencor), ACCELLERASE® XC (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 Xilanase (DSM), DEPOL® 333P (Biocatalysts Limit, Wales, UK), DEPOL® 740L. (Biocatalysts Limit, Wales, UK) e DEPOL® 762P (Biocatalysts Limit, Wales, UK).

[00208] Os exemplos de xilanases úteis nos métodos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, xilanase de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP: AAR63790; WO 94/21785), xilanases de *Aspergillus fumigatus* (WO 2006/078256; xil 3 SEQ ID NO: 129 [sequência de DNA] e SEQ ID NO: 130 [sequência de aminoácido deduzida]), *Penicillium pinophilum* (WO 2011/041405), *Penicillium* sp. (WO 2010/126772), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/079210) e GH10 de *Tricophaea saccata* (WO 2011/057083).

[00209] Os exemplos de beta-xilosidases úteis nos métodos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, beta-xilosidase de *Tricoderma reesei* (UniProtKB/TrEMBL número de acesso Q92458; SEQ ID NO: 131 [sequência de DNA] e SEQ ID NO: 132 [sequência de aminoácido deduzida]), *Talaromyces emersonii* (SwissProt número de acesso Q8X212) e *Neurospora crassa* (SwissProt número de acesso Q7SOW4).

[00210] Os exemplos de acetilxilan esterases úteis nos métodos da

presente invenção incluem, mas não são limitados a, acetilxilan esterases de *Aspergillus aculeatus* (WO 2010/108918), *Chaetomium globosum* (Uniprot número de acesso Q2GWX4), *Chaetomium gracile* (GeneSeqP número de acesso AAB82124), *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/073709), *Hypocrea jecorina* (WO 2005/001036), *Myceliophthora thermophila* (WO 2010/014880), *Neurospora crassa* (UniProt número de acesso q7s259), *Phaeosphaeria nodorum* (Uniprot número de acesso Q0UHI1) e *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/042846).

[00211] Os exemplos de feruloil esterases (ácido ferúlico esterases) úteis nos métodos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, feruloil esterases de *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/076122), *Neosartorya fischeri* (UniProt Número de acesso A1D9T4), *Neurospora crassa* (UniProt número de acesso Q9HGR3), *Penicillium aurantiogriseum* (WO 2009/127729) e *Thielavia terrestris* (WO 2010/053838 e WO 2010/065448).

[00212] Os exemplos de arabinofuranosidases úteis nos métodos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, arabinofuranosidases de *Aspergillus niger* (GeneSeqP número de acesso AAR94170), *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2006/114094 e WO 2009/073383) e *M. giganteus* (WO 2006/114094).

[00213] Os exemplos de alfa-glicuronidasas úteis nos métodos da presente invenção incluem, mas não são limitados a, alfa-glicuronidasas de *Aspergillus clavatus* (UniProt número de acesso alcc12), *Aspergillus fumigatus* (SwissProt número de acesso Q4WW45), *Aspergillus niger* (Uniprot número de acesso Q96WX9), *Aspergillus terreus* (SwissProt número de acesso Q0CJP9), *Humicola insolens* (WO 2010/014706), *Penicillium aurantiogriseum* (WO 2009/068565), *Talaromyces emersonii* (UniProt número de acesso Q8X211) e *Trichoderma reesei* (Uniprot número de acesso Q99024).

[00214] Os polipeptídeos tendo atividade enzimática usados nos métodos da presente invenção podem ser produzidos pela fermentação das cepas microbianas mencionadas acima em um meio nutriente contendo fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos adequados, usando procedimentos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Bennett, J. W. e LaSure, L. (eds.), *Mais Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Os meios adequados são disponíveis de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com as composições publicadas (por exemplo, em catálogos da American Type Culture Collection). As faixas de temperatura e outras condições adequadas para o cultivo e produção de enzima são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Bailey, J. E., e Ollis, D. F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

[00215] A fermentação pode ser qualquer método de cultivo de uma célula que resulte na expressão ou isolamento de uma enzima ou proteína. A fermentação, portanto, pode ser entendida como compreendendo cultivo de frasco agitado, ou fermentação em pequena ou larga escala (incluindo fermentações contínuas, de batelada, lote alimentado, ou estado sólido) em laboratório ou fermentadores industriais realizados em um meio adequado e sob condições que possibilitem que a enzima seja expressada ou isolada. As enzimas resultantes produzidas pelo métodos descritos acima podem ser recuperadas do meio de fermentação e purificadas pelos procedimentos convencionais.

### **Construção de ácidos nucleicos**

[00216] Um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo GH61, por exemplo, um polipeptídeo tendo atividade realçadora celulolítica, uma enzima celulolítica, uma enzima hemicelulolítica, etc., pode ser manipulada em uma variedade de modos para fornecer quanto a expressão do polipeptídeo pela construção de uma construção de ácido nucleico que compreende um

polinucleotídeo isolado que codifica o polipeptídeo operavelmente ligado a uma ou mais (por exemplo, várias) sequências de controle que direcionam a expressão da sequência codificadora em uma célula hospedeira adequada sob condições compatíveis com as sequências de controle. A manipulação da sequência do polinucleotídeo antes da sua inserção em um vetor pode ser desejável ou necessário dependendo do vetor de expressão. As técnicas para modificar sequências de polinucleotídeo que utilizam métodos de DNA recombinantes são bem conhecidos na técnica.

[00217] A sequência de controle pode ser um promotor, um polinucleotídeo que é reconhecido por uma célula hospedeira para a expressão de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo. O promotor contém sequências de controle transcricionais que medeiam a expressão do polipeptídeo. O promotor pode ser qualquer polinucleotídeo que mostra atividade transcricional na célula hospedeira incluindo promotores mutantes, truncados, e híbridos, e podem ser obtidos de genes que codificam polipeptídeos extracelular ou intracelular homólogos ou heterólogos para a célula hospedeira.

[00218] Os exemplos de promotores adequados para direcionar a transcrição das construções de ácido nucleico na presente invenção em uma célula hospedeira bacteriana são os promotores obtidos do gene da alfa-amilase de *Bacillus amiloliquefaciens* (amyQ), gene da alfa-amilase de *Bacillus licheniformis* (amil), gene da penicilinase do *Bacillus licheniformis* (penP), gene da amilase maltogênica do *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gene da levansucrase *Bacillus subtilis* (sacB), genes xilA e xilB *Bacillus subtilis*, gene *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse e Lereclus, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 97-107), operon *lac* da *E. coli*, promotor *trc* da *E. coli* (Egon *et al.*, 1988, *Gene* 69: 301-315), gene agarase *Streptomyces coelicolor* (dagA), e gene beta-lactamase procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731), assim como o promotor *tac*

(DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Outros promotores são descritos em “Useful proteins from recombinant bacteria” em Gilbert *et al.*, 1980, Scientific American, 242: 74-94; e em Sambrook *et al.*, 1989, supra. Os exemplos de promotores em tandem são divulgados na WO 99/43835.

[00219] Os exemplos de promotores adequados para direcionar a transcrição das construções de ácido nucleico na presente invenção em uma célula hospedeira fúngica filamentosa são promotores obtidos dos genes para acetamidase de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilase estável em ácido de *Aspergillus niger*, glicoamilase de *Aspergillus niger* ou *Aspergillus awamori* (glaA), TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, protease alcalina de *Aspergillus oryzae*, triose fosfato isomerase de *Aspergillus oryzae*, protease equivalente a tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglicosidade de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipase de *Rhizomucor miehei*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glicosidade de *Trichoderma reesei*, celobioidrolase I de *Trichoderma reesei*, celobioidrolase II de *Trichoderma reesei*, endoglicanase I de *Trichoderma reesei*, endoglicanase II de *Trichoderma reesei*, endoglicanase III de *Trichoderma reesei*, endoglicanase V de *Trichoderma reesei*, xilanase I de *Trichoderma reesei*, xilanase II de *Trichoderma reesei*, xilanase III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidase de *Trichoderma reesei*, e o fator de alongamento de tradução de *Trichoderma reesei*, assim como o promotor NA2-tpi (um promotor modificado de um gene da alfa-amilase neutra de *Aspergillus* em que o líder não traduzido foi substituído por um líder não traduzido de um gene da triose fosfate isomerase de *Aspergillus*; os exemplos não limitantes incluem promotores modificados de um gene da alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger* em que o líder não traduzido foi substituído por um líder não traduzido

de um gene da triose fosfate isomerase de *Aspergillus nidulans* ou *Aspergillus oryzae*); e seus promotores mutantes, truncados, e híbridos. Outros promotores são descritos na Patente U.S. N. 6.011.147.

[00220] Em um hospedeiro de levedura, os promotores úteis são obtidos dos genes para enolase de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinase *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), álcool desidrogenase/gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triose fosfato isomerase de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), e 3-fosfoglicerato cinase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outros promotores úteis para células hospedeiras de levedura são descritos por Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488.

[00221] A sequência de controle também pode ser um terminador de transcrição, que é reconhecida por uma célula hospedeira para terminar a transcrição. O terminador é operavelmente ligado ao terminal 3' do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo. Qualquer terminador que é funcional na célula hospedeira pode ser usado na presente invenção.

[00222] Os terminadores preferidos para as células hospedeiras bacterianas são obtidos a partir dos genes para a protease alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), alfa-amilase de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), e RNA ribossômico de *Escherichia coli* (*rrnB*).

[00223] Os terminadores preferidos para as células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidas a partir dos genes para a acetamidase de *Aspergillus nidulans*, antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, alfa-glicosidade de *Aspergillus niger*, TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, protease equivalente à tripsina de *Fusarium oxisporum*, beta-glucosidase de *Trichoderma reesei*, celobioidrolase I de *Trichoderma reesei*, celobioidrolase II de *Trichoderma reesei*, endoglucanase I de *Trichoderma reesei*, endoglucanase II de *Trichoderma reesei*, endoglucanase

III de *Trichoderma reesei*, endoglucanase V de *Trichoderma reesei*, xilanase I *Trichoderma reesei*, xilanase II *Trichoderma reesei*, xilanase III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidase de *Trichoderma reesei*, e fator de alongamento da tradução de *Trichoderma reesei*.

[00224] Os terminadores preferidos para as células hospedeiras de levedura são obtidos dos genes para a enolase de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outros terminadores úteis para células hospedeiras de levedura são descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[00225] A sequência de controle também pode ser uma região estabilizadora de mRNA a jusante de um promotor e a montante da sequência codificadora de um gene que aumenta a expressão do gene.

[00226] Os exemplos de regiões estabilizadoras de mRNA adequadas são obtidas do gene *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) e um gene *SP82* de *Bacillus subtilis* (Hue *et al.*, 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).

[00227] A sequência de controle também pode ser um líder, uma região não traduzida de um mRNA que é importante para a tradução pela célula hospedeira. O líder é operavelmente ligada ao terminal 5' do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo. Qualquer líder que seja funcional na célula hospedeira pode ser usado.

[00228] Os líderes preferidos para as células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidas dos genes para a TAKA amilase de *Aspergillus oryzae* e triose fosfato isomerase de *Aspergillus nidulans*.

[00229] Os líderes adequados para as células hospedeiras de levedura são obtidas a partir dos genes para a enolase de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato cinase de *Saccharomyces cerevisiae*, fator alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, e álcool desidrogenase/gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[00230] A sequência de controle também pode ser uma sequência de poliadenilação, uma sequência operavelmente ligada ao terminal 3' do polinucleotídeo e, quando transcrito, é reconhecido pela célula hospedeira como um sinal para adicionar resíduos de poliadenosina ao mRNA transcrito. Qualquer sequência de poliadenilação que seja funcional na célula hospedeira pode ser usada.

[00231] As sequências de poliadenilação preferidas para as células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidas a partir dos genes para a antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, alfa-glicosidase de *Aspergillus niger*, TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, protease equivalente à tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[00232] As sequências de poliadenilação úteis para células hospedeiras de levedura são descritas por Guo e Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

[00233] A sequência de controle também pode ser uma região de peptídeo de sinal codificadora que codifica um peptídeo de sinal ligado ao terminal N de um polipeptídeo e direciona o polipeptídeo no caminho secretor da célula. A extremidade 5' da sequência codificadora do polinucleotídeo pode inerentemente conter uma sequência codificadora de peptídeo de sinal naturalmente ligada na matriz de leitura de tradução com o segmento da sequência codificadora que codifica o polipeptídeo. Alternativamente, a extremidade 5' da sequência codificadora pode conter uma sequência codificadora de peptídeo de sinal que é estranha à sequência codificadora. Uma sequência codificadora de peptídeo de sinal estranha pode ser requerida onde a sequência codificadora não contém naturalmente uma sequência codificadora de peptídeo de sinal. Alternativamente, uma sequência codificadora de peptídeo de sinal estranha pode simplesmente substituir a sequência codificadora de peptídeo de sinal natural de modo a realçar a secreção do polipeptídeo. Entretanto, qualquer sequência codificadora de

peptídeo de sinal que direciona o polipeptídeo expressado no caminho secretor de uma célula hospedeira pode ser usada.

[00234] As sequências codificadoras de peptídeo de sinal eficazes para as células hospedeiras bacterianas são as sequências codificadoras de peptídeo de sinal obtidas a partir do genes para amilase maltogênica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamase de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus*, proteases neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), e prsA de *Bacillus subtilis*. Outros peptídeos de sinal são descritos por Simonen e Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

[00235] As sequências codificadoras de peptídeo de sinal eficazes para as células hospedeiras fúngicas filamentosas são as sequências codificadoras de peptídeo de sinal obtidas a partir dos genes para a amilase neutra de *Aspergillus niger*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, celulase de *Humicola insolens*, endoglicanase V de *Humicola insolens*, lipase de *Humicola lanuginosa*, e proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[00236] Os peptídeos de sinal úteis para as células hospedeiras de levedura são obtidas a partir dos genes para fator alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outras sequências codificadoras de peptídeo de sinal úteis são descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[00237] A sequência de controle também pode ser uma sequência codificadora de propeptídeo que codifica um propeptídeo posicionado no terminal N de um polipeptídeo. O polipeptídeo resultante é conhecido como uma proenzima ou propolipeptídeo (ou um zimogênio em alguns casos). Um propolipeptídeo é no geral inativo e pode ser convertido a um polipeptídeo ativo pela clivagem catalítica ou autocatalítica do propeptídeo do propolipeptídeo. A sequência codificadora de propeptídeo pode ser obtida a

partir dos genes para a protease alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), protease neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), lacase de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, e fator alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[00238] Onde tanto a sequência de peptídeo de sinal quanto a de propeptídeo estão presentes, a sequência de propeptídeo é posicionada a seguir do terminal N de um polipeptídeo e a sequência de peptídeo de sinal é posicionada a seguir do terminal N da sequência de propeptídeo.

[00239] Também pode ser desejável adicionar sequências reguladoras que regulam a expressão do polipeptídeo em relação ao crescimento da célula hospedeira. Os exemplos de sequências reguladoras são aqueles que fazem com que a expressão do gene seja ligada ou desligada em resposta a um estímulo químico ou físico, incluindo a presença de um composto regulador. Os sistemas reguladores em sistemas procarióticos incluem os sistemas operadores lac, tac, e trp. Em levedura, o sistema ADH2 ou sistema GAL1 pode ser usado. Em fungos filamentosos, o promotor da glicoamilase de *Aspergillus niger*, o promotor da TAKA alfa-amilase de *Aspergillus oryzae*, e o promotor da glicoamilase de *Aspergillus oryzae*, promotor da celobioidrolase I de *Trichoderma reesei*, e promotor da celobioidrolase II de *Trichoderma reesei* podem ser usados. Outros exemplos de sequências reguladoras são aquelas que possibilitam a amplificação do gene. em sistemas eucarióticos, Estas sequências reguladoras incluem o gene da diidrofoliato redutase que é amplificado na presença de metotrexato, e os genes da metalotioneína que são amplificados com metais pesados. Nestes casos, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo seria operavelmente ligado à sequência reguladora.

### **Vetores de expressão**

[00240] Os vários nucleotídeos e sequências de controle aqui descritos podem ser unidos entre si para produzir um vetor de expressão recombinante

que pode incluir um ou mais (por exemplo, vários) sítios de restrição convenientes para possibilitar a inserção ou substituição de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo, por exemplo um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica, uma enzima celulolítica, uma enzima hemicelulolítica, etc. em tais sítios. Alternativamente, o polinucleotídeo pode ser expressado inserindo-se o polinucleotídeo ou uma construção de ácido nucleico que compreende a sequência em um vetor apropriado para a expressão. Na criação do vetor de expressão, a sequência codificadora está localizada no vetor de modo que a sequência codificadora é operavelmente ligada com as sequências de controle apropriadas para a expressão.

[00241] O vetor de expressão recombinante pode ser qualquer vetor (por exemplo, um plasmídeo ou vírus) que pode ser convenientemente submetido aos procedimentos de DNA recombinante e pode realizar a expressão do polinucleotídeo. A escolha do vetor tipicamente dependerá da compatibilidade do vetor com a célula hospedeira na qual o vetor deva ser introduzido. O vetor pode ser um plasmídeo linear ou circular fechado.

[00242] O vetor pode ser um vetor que replica autonomamente, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, a replicação do qual é independente da replicação cromossômica, por exemplo, um plasmídeo, um elemento extracromossômico, um minicromossoma, ou um cromossoma artificial. O vetor pode conter qualquer meio para garantir a auto-replicação. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado junto com o(s) cromossoma(s) no(s) qual(is) o mesmo foi integrado. Além disso, um único vetor ou plasmídeo ou dois ou mais vetores ou plasmídeos que juntos contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula hospedeira, ou um transposon, pode ser usado.

[00243] O vetor preferivelmente contém um ou mais (por exemplo,

vários) marcadores selecionáveis que permitam seleção fácil de células transformadas, transfectadas, transduzidas, ou semelhantes. Um marcador selecionável é um gene, o produto do qual fornece resistência a biocida ou viral, resistência aos metais pesados, prototrofia aos auxótrofos, e outros.

[00244] Os exemplos de marcadores selecionáveis bacterianos são os genes *dal* de *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus subtilis*, ou marcadores que conferem resistência a antibiótico tal como resistência à ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomicina ou tetraciclina. Os marcadores adequados para as células hospedeiras de levedura incluem mas não são limitados a ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, e URA3. Os marcadores selecionáveis para o uso em uma célula hospedeira filamentosa fúngica incluem, mas não são limitados a, *adeA* (fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintase), *adeB* (fosforribosil-aminoimidazol sintase), *amdS* (acetamidase), *argB* (ornitina carbamoil transferase), *bar* (fosfinotricina acetiltransferase), *hph* (higromicina fosfotransferase), *niaD* (nitrato redutase), *pirG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilase), *sC* (sulfato adeniltransferase), e *trpC* (antranilato sintase), assim como equivalentes destes. Preferido para o uso em uma célula de *Aspergillus* são os genes *amdS* e *pirG* de *Aspergillus nidulans* ou *Aspergillus oryzae* e um gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. Preferidos para o uso em uma célula de *Trichoderma* são os genes *adeA*, *adeB*, *amdS*, *hph*, e *pyrG*.

[00245] O marcador selecionável pode ser um sistema de marcador selecionável dual como descrito na WO 2010/039889. Em um aspecto, o marcador selecionável dual é um sistema de marcador selecionável dual *hph-tk*.

[00246] O vetor preferivelmente contém um elemento(s) que permite(m) a integração do vetor no genoma da célula hospedeira ou replicação autônoma do vetor na célula independente do genoma.

[00247] Para a integração no genoma da célula hospedeira, o vetor

pode contar com a sequência do polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo ou qualquer outro elemento do vetor para a integração no genoma pela recombinação homóloga ou não homóloga. Alternativamente, o vetor pode conter polinucleotídeos adicionais para direcionar a integração pela recombinação homólogo no genoma da célula hospedeira em uma localização(ões) precisa(s) no cromossoma(s). Para aumentar a probabilidade de integração em uma localização precisa, os elementos integracionais devem conter um número suficiente de ácidos nucleicos, tais como de 100 a 10.000 pares de base, de 400 a 10.000 pares de base, e de 800 a 10.000 pares de base, que têm um alto grau de identidade de sequência com a sequência alvo correspondente para realçar a probabilidade de recombinação homóloga. Os elementos integracionais podem ser qualquer sequência que seja homóloga com a sequência alvo no genoma da célula hospedeira. Além disso, os elementos integracionais podem ser polinucleotídeos não codificador ou codificador. Por outro lado, o vetor pode ser integrado no genoma da célula hospedeira pela recombinação não homóloga.

[00248] Para a replicação autônoma, o vetor pode compreender ainda uma origem de replicação que possibilita o vetor replicar autonomamente na célula hospedeira em questão. A origem de replicação pode ser qualquer replicador plasmídico que medeia a replicação autônoma que funciona em uma célula. Os termos “origem de replicação” ou “replicador plasmídico” significam um polinucleotídeo que possibilita um plasmídeo ou vetor replicar *in vivo*.

[00249] Os exemplos de origem bacteriana de replicação são as origens de replicação dos plasmídeos pBR322, pUC19, pACYC177, e pACYC184 que permitem a replicação na *E. coli*, e pUB110, pE194, pTA1060, e pAMB1 que permitem a replicação em *Bacillus*.

[00250] Os exemplos de origens de replicação para o uso em uma célula hospedeira de levedura são a origem 2 micron de replicação, ARS1,

ARS4, a combinação de ARS1 e CEN3, e a combinação de ARS4 e CEN6.

[00251] Os exemplos de origens de replicação úteis em uma célula fúngica filamentosa são AMA1 e ANS1 (Gems *et al.*, 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 2000/24883). A isolamento do gene AMA1 e a construção de plasmídeos ou vetores que compreendem o gene podem ser realizadas de acordo com os métodos divulgados na WO 00/24883.

[00252] Mais do que uma cópia de um polinucleotídeo pode ser inserido em uma célula hospedeira para aumentar a produção de um polipeptídeo. Um aumento no número de cópia do polinucleotídeo pode ser obtido pela integração de pelo menos uma cópia adicional da sequência no genoma da célula hospedeira ou pela inclusão de um gene marcador selecionável amplificável com o polinucleotídeo onde as células contendo cópias amplificadas do gene marcador selecionável, e desse modo cópias adicionais do polinucleotídeo, podem ser selecionadas cultivando-se as células na presença do agente selecionável apropriado.

[00253] Os procedimentos usados para ligar os elementos descritos acima para construir os vetores de expressão recombinantes são bem conhecidos por uma pessoa habilitada na técnica (ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

#### Células Hospedeiras

[00254] As células hospedeiras recombinantes que compreendem um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica, uma enzima celulolítica, uma enzima hemicelulolítica, etc., podem ser vantajosamente usadas na produção recombinante do polipeptídeo. Uma construção ou vetor que compreende um tal polinucleotídeo é introduzido em uma célula hospedeira de modo que o vetor seja mantido como um integrante cromossômico ou como um vetor extra-cromossômico auto-replicante como descrito mais no princípio. O termo

“célula hospedeira” abrange qualquer progênie de uma célula precursora que não é idêntica à célula precursora devido às mutações que ocorrem durante a replicação. A escolha de uma célula hospedeira dependerá um grande grau depende do gene que codifica o polipeptídeo e sua fonte.

[00255] A célula hospedeira pode ser qualquer célula útil na produção recombinante de um polipeptídeo, por exemplo, um procariota ou um eucariota.

[00256] A célula hospedeira procariótica pode ser qualquer bactéria Gram positiva ou Gram negativa. As bactérias Gram positivas incluem, mas não são limitadas a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, e *Streptomyces*. As bactérias Gram-negativas incluem, mas não são limitadas a, *Campilobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, e *Ureaplasma*.

[00257] A célula hospedeira bacteriana pode ser qualquer célula de *Bacillus* incluindo, mas não limitado a, às células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, e *Bacillus thuringiensis*.

[00258] A célula hospedeira bacteriana também pode ser qualquer célula *Streptococcus* incluindo, mas não limitado a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, e *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*.

[00259] A célula hospedeira bacteriana também pode ser qualquer célula de *Streptomyces* incluindo, mas não limitado a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, e *Streptomyces lividans*.

[00260] A introdução de DNA em uma célula de *Bacillus* pode ser

efetuada pela transformação de protoplasto (ver, por exemplo, Chang e Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115), transformação de célula competente (ver, por exemplo, Young e Spizizen, 1961, *J. Bacteriol.* 81: 823-829, ou Dubnau e Davidoff-Abelson, 1971, *J. Mol. Biol.* 56: 209-221), pela eletroporação (ver, por exemplo, Shigekawa e Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), ou conjugação (ver, por exemplo, Koehler e Thorne, 1987, *J. Bacteriol.* 169: 5271-5278). A introdução de DNA em uma célula de *E. coli* pode ser efetuada pela transformação de protoplasto (ver, por exemplo, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) ou eletroporação (ver, por exemplo, Dower *et al.*, 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145). A introdução de DNA em uma célula de *Streptomyces* pode ser efetuada pela transformação de protoplasto, eletroporação (ver, por exemplo, Gong *et al.*, 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), conjugação (ver, por exemplo, Mazodier *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585), ou transdução (ver, por exemplo, Burke *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294). A introdução de DNA em uma célula de *Pseudomonas* pode ser efetuada pela eletroporação (ver, por exemplo, Choi *et al.*, 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) ou conjugação (ver, por exemplo, Pinedo e Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57). A introdução de DNA em uma célula de *Streptococcus* pode ser efetuada pela competência natural (ver, por exemplo, Perry e Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32: 1295-1297), transformação de protoplasto (ver, por exemplo, Catt e Jollick, 1991, *Microbios.* 68: 189-207), eletroporação (ver, por exemplo, Buckley *et al.*, 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804) ou conjugação (ver, por exemplo, Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436). Entretanto, qualquer método conhecido na técnica para introduzir DNA em uma célula hospedeira pode ser usado.

[00261] A célula hospedeira também pode ser uma eucariota, tal como uma célula de mamífero, inseto, planta, ou fungo.

[00262] A célula hospedeira pode ser uma célula fúngica. “Fungos”

como aqui usado inclui os filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, e *Zygomycota* assim como os *Oomycota* e todos os fungos mitospórico (como definidos por Hawksworth *et al.*, Em, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edição, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK).

[00263] A célula hospedeira fúngica pode ser uma célula de levedura. “Levedura” como aqui usado inclui levedura ascosporógena (*Endomycetales*), levedura basidiosporógena, e levedura pertencente aos Fungos Imperfeitos (*Blastomycetes*). Visto que a classificação de levedura pode mudar no futuro, para os propósitos desta invenção, a levedura deve ser definida como descrita em *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, Passmore, e Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Série Nº 9, 1980).

[00264] A célula hospedeira de levedura pode ser uma célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia*, tal como uma célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* ou *Yarrowia lipolitica*.

[00265] A célula hospedeira fúngica pode ser uma célula fúngica filamentosa. “Fungos Filamentosos” incluem todas as formas filamentosas da subdivisão *Eumycota* e *Oomycota* (como definida por Hawksworth *et al.*, 1995, supra). Os fungos filamentosos são no geral caracterizados por um composto de parede micelial de quitina, celulose, glicano, quitosano, manana, e outros polissacarídeos complexos. O crescimento vegetativo é pelo alongamento hifal e o catabolismo de carbono é obrigatoriamente aeróbico. Ao contrário, o crescimento vegetativo pelas leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae* é pelo brotamento de um talo unicelular e o catabolismo de carbono pode ser fermentativo.

[00266] A célula hospedeira fúngica filamentosa pode ser uma célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophillum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, ou *Trichoderma*.

[00267] Por exemplo, a célula hospedeira fúngica filamentosa pode ser uma célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminarum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxisporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, ou *Trichoderma viride*.

[00268] As células fúngicas podem ser transformadas por um processo

que envolve formação de protoplasto, transformação dos protoplastos, e regeneração da parede celular em uma maneira conhecida por si. Os procedimentos adequados para a transformação de células hospedeiras de *Aspergillus* e *Trichoderma* são descritos na EP 238023, Yelton *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474 e Christensen *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422. Os métodos adequados para transformar espécies de *Fusarium* são descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156, e WO 96/00787. A levedura pode ser transformada usando os procedimentos descritos por Becker e Guarente, Em Abelson, J. N. e Simon, M. I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nova Iorque; Ito *et al.*, 1983, J. Bacteriol. 153: 163; e Hinnen *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

### **Métodos de Produção**

[00269] Métodos para produzir um polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica, uma enzima celulolítica, uma enzima hemicelulolítica, etc., compreendem (a) cultivar uma célula, que na sua forma do tipo selvagem é capaz de produzir o polipeptídeo, sob condições condutivas para a produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[00270] Alternativamente, os métodos para produzir um polipeptídeo, por exemplo, um polipeptídeo GH61 tendo atividade realçadora celulolítica, uma enzima celulolítica, uma enzima hemicelulolítica, etc., compreendem (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante sob condições condutivas para a produção do polipeptídeo e (b) recuperar o polipeptídeo.

[00271] Nos métodos de produção, as células são cultivadas em um meio nutriente adequado para a produção do polipeptídeo usando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, as células podem ser cultivadas pelo cultivo em frasco agitado, ou fermentação em pequena escala ou grande

escala (incluindo fermentações contínuas, em lote, lote alimentado, ou de estado sólido) em fermentadores de laboratório ou industriais em um meio adequado e sob condições que permitam que o polipeptídeo seja expressado e/ou isolado. O cultivo ocorre em um meio nutriente adequado que compreende fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na técnica. Os meios adequados são disponíveis de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (por exemplo, em catálogos da American Type Culture Collection). Se o polipeptídeo é secretado no meio nutriente, o polipeptídeo pode ser recuperado diretamente do meio. Se o polipeptídeo não é secretado, o mesmo pode ser recuperado a partir de lisados de célula.

[00272] Os polipeptídeos podem ser detectados usando métodos conhecidos na técnica que são específicos para os polipeptídeos. Estes métodos de detecção incluem, mas não são limitados ao uso de anticorpos específicos, formação de um produto de enzima, ou desaparecimento de um substrato de enzima. Por exemplo, um ensaio de enzima pode ser usado para determinar a atividade do polipeptídeo.

[00273] O polipeptídeo pode ser recuperado usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser recuperado do meio nutriente pelos procedimentos convencionais incluindo, mas não limitados a, coleta, centrifugação, filtração, extração, secagem por pulverização, evaporação, ou precipitação. Em um aspecto, o caldo de fermentação inteiro é recuperado.

[00274] O polipeptídeo pode ser purificado por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, cromatografia (por exemplo, de troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização, e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoeétrica preparativa), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação com sulfato de amônio), SDS-PAGE, ou extração

(ver, por exemplo, Protein Purification, Janson e Ryden, editores, VCH Publishers, Nova Iorque, 1989) para se obter polipeptídeo substancialmente puro.

[00275] Em um aspecto alternativo, o polipeptídeo não é recuperado, mas ainda uma célula hospedeira expressando um polipeptídeo é usado como um fonte do polipeptídeo.

[00276] A presente invenção é descrita ainda pelos exemplos que seguem que não devem ser interpretados como limitando o escopo da invenção.

### **Exemplos**

#### **Exemplo 1: Colheita de bagaço e frações de folhas e galhos da cana de açúcar**

[00277] As plantas de cana de açúcar inteira foram colhidas usando uma máquina colheitadeira mecânica, que corta as plantas aproximadamente 10 a 20 cm acima do solo e subsequentemente corta caules, topos e folhas (secas e verdes) em pedaços menores. Os pedaços menores de caules, topos e folhas foram depois separados por um ciclone de ar da máquina colheitadeira, por meio do qual o material de baixa densidade (folhas e galhos), principalmente folhas e topos, foram separados por sopro a uma porcentagem desejada. A separação por sopro pode ser regulada dependendo de quão grande uma porcentagem de folhas e galhos deva ser coletada.

[00278] Neste caso, aproximadamente 50 % do refugo da cana de açúcar foi coletado junto com a coleta dos caules. O material colhido foi continuamente transferido para os vagões de colheita. Uma quantidade representativa das frações de folhas e topos foi tirada de vários vagões. A fração de refugo foi manualmente separada dos caules, simulando uma separação antes de moer em um moinho. As frações de folhas e galhos separadas foram manualmente empacotadas a vácuo 3 a 5 horas depois do processo de colheita para preservar a umidade e armazenadas a 4°C até o uso.

A fração de bagaço foi coletada do processo de moagem de cana de açúcar padrão, no último estágio de moagem tomando-se manualmente várias amostras de bagaço. O material de bagaço foi subsequentemente empacotado a vácuo para preservar a umidade da fração e armazenado a 4°C até o uso.

**Exemplo 2: Hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos pré-tratados com 1 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

[00279] O bagaço da cana de açúcar e as frações de folhas e galhos (Exemplo 1) foram cada um tratados a 22 % de sólidos totais (TS) com 1,0 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 175°C por 5 minutos usando um sistema de extração acelerado com solvente (ASE 350 Automatic Integrated System; Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). O líquido extraído e os sólidos extraídos para cada um do bagaço e frações de folhas e galhos pré-tratados foram misturados juntos antes da hidrólise. As análises de composição dos substratos brutos e pré-tratados foram realizadas usando os métodos padrão do National Renewable Energy Laboratory (NREL, Golden. CO, USA). A celulose e hemicelulose foram determinados por uma hidrólise com ácido sulfúrico de dois estágios com análise subsequente de açúcares pela cromatografia líquida de alto desempenho usando o Procedimento Analítico Padrão da NREL #002. A lignina foi determinada gravimetricamente depois de hidrolisar as frações de celulose e hemicelulose com ácido sulfúrico usando o Procedimento Analítico Padrão NREL #003. Depois do pré-tratamento os sólidos recuperados foram 71,5 % e 68,1 % para o bagaço e as frações de folhas e galhos, respectivamente. Em ambos os casos, mais do que 90 % da celulose permaneceu nos sólidos, aproximadamente 70 % da hemicelulose foi removida dos sólidos para a fase de líquido e quase toda a lignina permaneceu nos sólidos.

[00280] Os substratos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática usando uma escala de pasta fluida de 20 g a 11 % de TS, pH 5,0 e 50°C com uma composição de enzima composta de Cellic® CTec2

(Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) (daqui em diante aludida como “composição de enzima celulolítica”). A composição de enzima celulolítica foi adicionada nas dosagens de 0,02, 0,04 e 0,06 g por grama de celulose por 120 horas. As amostras foram coletadas com o tempo. Depois de 120 horas de hidrólise enzimática, uma composição de enzima composta de 95 % de Cellic® CTec (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) e 5 % de Cellic® HTec (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) foi adicionada em excesso a 50 % por grama de celulose de modo a avaliar a acessibilidade da celulose. Depois, novas amostras foram coletadas depois de pelo menos 48 horas.

[00281] As amostras coletadas foram filtradas usando 0,20 µm de filtros de seringa (Millipore, Bedford, MA, USA) e os filtrados foram analisados quanto ao teor de açúcar como descrito abaixo. Quando não usadas imediatamente, as alíquotas filtradas foram congeladas a -20°C. As concentrações de açúcar de amostras diluídas em 0,005 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram medidos usando uma coluna 4,6 x 250 mm de AMINAX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) pela eluição com 0,05 % p/p de ácido benzóico - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M a 65°C em uma taxa de fluxo de 0,6 ml por minuto e quantificação pela integração do sinal da glicose a partir da detecção do índice refrativo (CHEMSTATION®, AGILENT® 1100 HPLC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) calibrada pelas amostras de açúcar puro. A glicose resultante foi usada para calcular a porcentagem de rendimento de glicose a partir de glicanos para cada reação. As concentrações de açúcar medidas foram ajustadas para o fator de diluição apropriado. As concentrações líquidas dos açúcares enzimaticamente produzidos foram determinados pelo ajuste das concentrações de açúcar medidas para as concentrações de açúcar de base correspondentes na biomassa não lavada no ponto de tempo zero. Todos os dados de processamento da HPLC foram realizados usando o software EXCEL® da MICROSOFT (Microsoft, Ricoland, WA, USA).

[00282] O grau de conversão da celulose para glicose foi calculado de acordo com a equação que segue:

$$\% \text{ de rendimento de glicose} = (\text{concentração de glicose} / \text{concentração de glicose em uma digestão limite}) \times 100.$$

[00283] A concentração de glicose em uma digestão limite foi determinada de acordo com a equação que segue levando-se em conta a análise da composição do material pré-tratado, os sólidos insolúveis e o volume líquido na hidrólise:

[00284] Concentração de glicose em uma digestão limite = [Peso de biomassa pré-tratada x % de Sólidos Insolúveis na biomassa pré-tratada x % de celulose x 1,111 x 0,1] / [Peso da pasta fluida na hidrólise - sólidos totais na hidrólise].

[00285] O fator de 1,111 leva em conta o aumento na massa quando a celulose é convertida para glicose. O fator de 0,1 transforma % em g/L. No denominador está o peso do líquido na hidrólise. Assumindo uma densidade de 1,0, o volume do líquido da hidrólise contém os açúcares. Os pontos de dados em duplicata foram medidos e o desvio padrão foi calculado.

[00286] Os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática do bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos pré-tratados são mostrados na Figura 1. Em cada dosagem de enzima, os níveis de glicose mais altos foram liberados da fração de refugo pré-tratada quando comparados com o bagaço pré-tratado indicando que a digestibilidade enzimática da fração de refugo pré-tratada foi mais eficiente do que com o bagaço pré-tratado.

### **Exemplo 3: Hidrólise enzimática de bagaço e frações de refugo da cana de açúcar pré-tratados com 0,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

[00287] O bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos (Exemplo 1) foram cada um tratados a 22 % de TS com 0,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 175°C por 5 minutos usando um sistema de extração acelerado com solvente como descrito no Exemplo 2. O líquido extraído e os sólidos extraídos para

cada um de bagaço e frações de folhas e galhos pré-tratados foram misturados juntos antes da hidrólise. As análises de composição dos substratos bruto e pré-tratado foram realizadas usando métodos padrão NREL de acordo com o Exemplo 2. Depois do pré-tratamento os sólidos recuperados foram de 76,2 % e 79,2 % para o bagaço e frações de folhas e galhos, respectivamente. Em ambos os casos, mais do que 90 % da celulose permaneceram nos sólidos, 75 % e 50 % da hemicelulose para o bagaço e frações de folhas e galhos, respectivamente, foram removidos dos sólidos para a fase líquida e quase toda a lignina permaneceu nos sólidos.

[00288] Os substratos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática usando uma escala de pasta fluida de 20 g a 11 % de TS, pH 5,0 e 50°C com a composição da enzima celulolítica (Exemplo 2; Cellic® CTec2) nas dosagens de 0,02, 0,04 e 0,06 g por grama de celulose por 120 horas. As amostras foram coletadas com o tempo. Depois de 120 horas de hidrólise enzimática, uma composição de enzima composta de 95 % de Cellic® CTec e 5 % de Cellic® HTec foi adicionada em excesso a 50 % por grama de celulose de modo a avaliar a acessibilidade da celulose. Depois, novas amostras foram coletadas depois de um adicional de 48 horas.

[00289] As amostras coletadas foram filtradas usando filtros de seringa de 0,20 µm e os filtrados foram analisados quanto ao teor de açúcar como descrito no Exemplo 2. A glicose resultante foi usada para calcular a porcentagem de rendimento de glicose a partir de glicanos para cada reação de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 2.

[00290] Os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática do bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos pré-tratados são mostrado na Figura 2. Em cada dosagem de enzima, níveis de glicose mais altos foram liberados da fração de refugo pré-tratada em comparação com o bagaço pré-tratado indicando que a digestibilidade enzimática da fração de refugo pré-tratada foi mais eficiente do que com o bagaço pré-tratado.

**Exemplo 4: Hidrólise enzimática de bagaço e frações de refugo da cana de açúcar pré-tratados com 6 % de NaOH**

[00291] O bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos (Exemplo 1) foram cada um tratados a 12 % de TS com 6 % de NaOH a 120°C por 120 minutos em béquers Lab-O-Mat. As análises de composição dos substratos brutos e pré-tratados foram realizadas usando métodos padrão NREL de acordo com o Exemplo 2. Depois do pré-tratamento os sólidos recuperados foram de 91,2 % e 80,9 % para o bagaço e frações de folhas e galhos, respectivamente. Em ambos os casos, aproximadamente 100 % de celulose permaneceram nos sólidos e 10 % e 20 % para o bagaço e frações de folhas e galhos, respectivamente, da hemicelulose foram removidos dos sólidos para a fase líquida.

[00292] Os substratos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática usando uma escala de pasta fluida de 20 g a 11 % de TS, pH 5,0 e 50°C com a composição de enzima celulolítica (Exemplo 2; Cellic® CTec2) nas dosagens de 0,02, 0,04 e 0,06 g por grama de celulose por 120 horas. As amostras foram coletadas com o tempo. Depois de 120 horas de hidrólise enzimática, uma composição de enzima composta de 95 % de Cellic® CTec e 5 % de Cellic® HTec foi adicionada em excesso a 50 % por grama de celulose de modo a avaliar a acessibilidade da celulose. Depois, novas amostras foram coletadas depois de mais 48 horas.

[00293] As amostras coletadas foram filtradas usando filtros de seringa de 0,20 µm e os filtrados foram analisados quanto ao teor de açúcar como descrito no Exemplo 2. A glicose resultante foi usada para calcular a porcentagem do rendimento de glicose a partir de glicanos para cada reação de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 2.

[00294] Os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado e frações de folhas e galhos são mostrados na Figura 3. Em cada dosagem de enzima, níveis de glicose mais altos foram liberados da fração de

refugo pré-tratada em comparação com o bagaço pré-tratado indicando que a digestibilidade enzimática da fração de refugo pré-tratada foi mais eficiente do que com o bagaço pré-tratado.

**Exemplo 5: Hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado e frações de refugo da cana de açúcar (auto-hidrólise)**

[00295] O bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos (Exemplo 1) foram cada um tratados a 20 % de TS por 8 minutos a 205°C usando reatores tubulares em um banho fluidizado SBL-2 (Techne, Bibby Scientific US, Burlington, NJ, USA). As análises composicionais dos substratos brutos e pré-tratados foram realizadas usando métodos padrão NREL de acordo com o Exemplo 2.

[00296] Os substratos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática usando uma escala de pasta fluida de 20 g a 5 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,03 g por grama de celulose por 144 horas. As amostras foram coletadas com o tempo.

[00297] As amostras coletadas foram filtradas usando filtros de seringa de 0,20 µm e os filtrados foram analisados quanto ao teor de açúcar como descrito no Exemplo 2. A glicose resultante foi usada para calcular a porcentagem de rendimento de glicose a partir de glicanos para cada reação de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 2.

[00298] O rendimento de glicose da hidrólise enzimática do bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos pré-tratados são mostrados na Figura 4. Os níveis de glicose mais altos foram liberados da fração de refugo pré-tratada em comparação com o bagaço pré-tratado indicando que a digestibilidade enzimática da fração de refugo pré-tratada foi mais eficiente do que com o bagaço pré-tratado.

**Exemplo 6: Hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados em um reator de Parr (auto-hidrólise)**

[00299] O bagaço da cana de açúcar com 50 % de umidade e refugo da cana de açúcar com 50 % de umidade foram pré-tratados em um Reator de Parr de 2 Litros (Parr Instrument Company, Molina, ILA, USA) em condição auto com uma temperatura de 205°C por 8 minutos. As análises composicionais dos substratos brutos e pré-tratados foram realizadas usando métodos padrão NREL de acordo com o Exemplo 2.

[00300] Os substratos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática usando uma escala de pasta fluida de 20 g a 5 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,04 g por grama de celulose por 144 horas. As amostras foram coletadas com o tempo.

[00301] As amostras coletadas foram filtradas usando filtros de seringa de 0,20 µm e os filtrados foram analisados quanto ao teor de açúcar como descrito no Exemplo 2. A glicose resultante foi usada para calcular a porcentagem de rendimento de glicose a partir de glicanos para cada reação de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 2.

[00302] Os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática do bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos pré-tratados são mostrados na Figura 5. Os níveis de glicose mais altos foram liberados da fração de refugo pré-tratada em comparação com o bagaço pré-tratado indicando que a digestibilidade enzimática da fração de refugo pré-tratada foi mais eficiente do que com o bagaço pré-tratado.

**Exemplo 7: Hidrólise enzimática de bagaço da cana de açúcar e refugo da cana de açúcar pré-tratados com 0,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em um reator de Parr (explosão de vapor de ácido diluído)**

[00303] O bagaço da cana de açúcar com 50 % de umidade e refugo da cana de açúcar com 50 % de umidade foram pré-tratados em um Reator de Parr de 2 Litros com 0,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> contra os sólidos a 205° C por 8 minutos. As análises composicionais dos substratos brutos e pré-tratados foram realizadas usando métodos padrão NREL de acordo com o Exemplo 2.

[00304] Os substratos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática usando uma escala de pasta fluida de 20 g a 5 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,04 g por grama de celulose por 144 horas. As amostras foram coletadas com o tempo.

[00305] As amostras coletadas foram filtradas usando filtros de seringa de 0,20 µm e os filtrados foram analisados quanto ao teor de açúcar como descrito no Exemplo 2. A glicose resultante foi usada para calcular a porcentagem de rendimento de glicose a partir de glicanos para cada reação de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 2.

[00306] Os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática do bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos pré-tratados são mostrados na Figura 6. Os níveis de glicose mais altos foram liberados da fração de refugo pré-tratada em comparação com o bagaço pré-tratado indicando que a digestibilidade enzimática da fração de refugo pré-tratada foi mais eficiente do que com o bagaço pré-tratado.

#### **Exemplo 8: Hidrólise enzimática de bagaço de cana e folhas e galhos de cana pré-tratados com 2,5 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> no ASE**

[00307] O bagaço da cana de açúcar e as frações de folhas e galhos (Exemplo 1) foram cada um tratados a 15 % de TS com 2,5 % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> contra sólidos a 190°C por 20 minutos usando um sistema de extração acelerado com solvente como descrito no Exemplo 2. O líquido extraído e os sólidos extraídos para cada um do bagaço pré-tratado e frações de folhas e galhos foram misturados juntos antes da hidrólise. As análises de composição dos substratos brutos e pré-tratados foram realizadas usando métodos padrão NREL de acordo com o Exemplo 2.

[00308] Os substratos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática usando uma escala de pasta fluida de 20 g a 8 % de TS, pH 5,0 e 50°C com Cellic® CTec2 em uma dosagem de 0,07 g por grama de celulose por 168 horas. As amostras foram coletadas com o tempo.

[00309] As amostras coletadas foram filtradas usando filtros de seringa de 0,20 µm e os filtrados foram analisados quanto ao teor de açúcar como descrito no Exemplo 2. A glicose resultante foi usada para calcular a porcentagem de rendimento de glicose a partir de glicanos para cada reação de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 2.

[00310] Os rendimentos de glicose da hidrólise enzimática do bagaço da cana de açúcar e frações de folhas e galhos pré-tratados são mostrados na Figura 7. Os níveis de glicose mais altos foram liberados da fração de refugo pré-tratada em comparação com o bagaço pré-tratado indicando que a digestibilidade enzimática da fração de refugo pré-tratada foi mais eficiente do que com o bagaço pré-tratado.

[00311] A presente invenção é descrito ainda pelos parágrafos numerados que seguem:

[1] Um método de degradar ou converter refugo da cana de açúcar, que compreende: separar o refugo da cana de açúcar da cana de açúcar e sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima.

[2] O método do parágrafo 1, em que o refugo da cana de açúcar é separado dos caules da cana de açúcar.

[3] O método dos parágrafos 1 ou 2, em que o refugo da cana de açúcar é moído.

[4] O método de qualquer um dos parágrafos de 1 a 3, em que o refugo da cana de açúcar é pré-tratado.

[5] O método de qualquer um dos parágrafos de 1 a 4, em que a composição de enzima compreende uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma celulase, um polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, uma hemicelulase, uma esterase, uma expansina, uma lacase, uma enzima ligninolítica, uma pectinase, uma peroxidase, uma protease e uma suolenina.

[6] O método do parágrafo 5, em que a celulase é uma ou mais

enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma endoglicanase, uma celobioidrolase e uma beta-glicosidase.

[7] O método do parágrafo 5, em que the hemicelulase é uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma xilanase, uma acetilxilan esterase, uma feruloil esterase, uma arabinofuranosidase, uma xilosidase e uma glicuronidase.

[8] O método de qualquer um dos parágrafos de 1 a 7, em que o refugo da cana de açúcar degradado é um açúcar.

[9] O método do parágrafo 8, em que o açúcar é selecionado do grupo que consiste de glicose, xilose, manose, galactose e arabinose.

[10] O método de qualquer um dos parágrafos de 1 a 9, que compreende adicionalmente recuperar o refugo da cana de açúcar degradado.

[11] Um método de produzir um produto de fermentação, que compreende: (a) colher e separar o refugo da cana de açúcar da cana de açúcar; (b) pré-tratar o refugo da cana de açúcar; (c) sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima; (d) fermentar o refugo da cana de açúcar sacarificado com um ou mais microrganismos de fermentação para produzir o produto de fermentação; e (e) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[12] O método do parágrafo 11, em que o refugo da cana de açúcar é separado dos caules da cana de açúcar.

[13] O método dos parágrafos 11 ou 12, em que o refugo da cana de açúcar é moído.

[14] O método de qualquer um dos parágrafos de 11 a 13, em que o refugo da cana de açúcar é pré-tratado.

[15] O método de qualquer um dos parágrafos de 11 a 14, em que a composição de enzima compreende uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma celulase, um polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, uma hemicelulase, uma esterase, uma

expansina, uma lacase, uma enzima ligninolítica, uma pectinase, uma peroxidase, uma protease e uma suolenina.

[16] O método do parágrafo 15, em que a celulase é uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma endoglicanase, uma celobioidrolase e uma beta-glicosidase.

[17] O método do parágrafo 15, em que a hemicelulase é uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma xilanase, uma acetilxilan esterase, uma feruloil esterase, uma arabinofuranosidase, uma xilosidase e uma glicuronidase.

[18] O método de qualquer um dos parágrafos de 11 a 17, em que as etapas (c) e (d) são realizadas simultaneamente em uma sacarificação e fermentação simultâneas.

[19] O método de qualquer um dos parágrafos de 11 a 18, em que o produto de fermentação é um álcool, um alcano, um cicloalcano, um alqueno, um aminoácido, um gás, isopreno, uma cetona, um ácido orgânico, ou policetídeo.

[20] Um método de produzir um produto de fermentação, que compreende: (a) sacarificar o refugo da cana de açúcar com uma composição de enzima; (b) fermentar o refugo da cana de açúcar sacarificado com um ou mais microrganismos de fermentação para produzir o produto de fermentação; e (c) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[21] O método do parágrafo 20, em que o refugo da cana de açúcar é separado dos caules da cana de açúcar.

[22] O método dos parágrafos 20 ou 21, em que o refugo da cana de açúcar é moído.

[23] O método de qualquer um dos parágrafos de 20 a 22, em que o refugo da cana de açúcar é pré-tratado.

[24] O método de qualquer um dos parágrafos de 20 a 23, em que a composição de enzima compreende uma ou mais enzimas selecionadas

do grupo que consiste de uma celulase, um polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, uma hemicelulase, uma esterase, uma expansina, uma lacase, uma enzima ligninolítica, uma pectinase, uma peroxidase, uma protease e uma suolenina.

[25] O método do parágrafo 24, em que a celulase é uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma endoglicanase, uma celobioidrolase e uma beta-glicosidase.

[26] O método do parágrafo 24, em que a hemicelulase é uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma xilanase, uma acetilxilan esterase, uma feruloil esterase, uma arabinofuranosidase, uma xilosidase e uma glicuronidase.

[27] O método de qualquer um dos parágrafos de 20 a 26, em que as etapas (a) e (b) são realizadas simultaneamente em uma sacarificação e fermentação simultâneas.

[28] O método de qualquer um dos parágrafos de 20 a 27, em que o produto de fermentação é um álcool, um alcano, um cicloalcano, um alqueno, um aminoácido, um gás, isopreno, uma cetona, um ácido orgânico, ou policetídeo.

[29] Um método de fermentar o refugo da cana de açúcar, que compreende: fermentar o refugo da cana de açúcar com um ou mais microrganismos de fermentação, em que o refugo da cana de açúcar é sacarificado com uma composição de enzima.

[30] O método do parágrafo 29, em que o refugo da cana de açúcar é separado dos caules da cana de açúcar.

[31] O método dos parágrafos 29 ou 30, em que o refugo da cana de açúcar é moído.

[32] O método de qualquer um dos parágrafos de 29 a 31, em que o refugo da cana de açúcar é pré-tratado antes da sacarificação.

[33] O método de qualquer um dos parágrafos de 29 a 32, em

que a composição de enzima compreende uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma celulase, um polipeptídeo GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, uma hemicelulase, uma esterase, uma expansina, uma lacase, uma enzima ligninolítica, uma pectinase, uma peroxidase, uma protease e uma suolenina.

[34] O método do parágrafo 33, em que a celulase é uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma endoglicanase, uma celobioidrolase e uma beta-glicosidase.

[35] O método do parágrafo 33, em que a hemicelulase é uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma xilanase, uma acetilxilan esterase, uma feruloil esterase, uma arabinofuranosidase, uma xilosidase e uma glicuronidase.

[36] O método de qualquer um dos parágrafos de 29 a 35, em que a fermentação do refugo da cana de açúcar produz um produto de fermentação.

[37] O método do parágrafo 36, que compreende adicionalmente recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[38] O método dos parágrafos 36 ou 37, em que o produto de fermentação é um álcool, um alcano, um cicloalcano, um alqueno, um aminoácido, um gás, isopreno, uma cetona, um ácido orgânico, ou policetídeo.

[39] O método de qualquer um dos parágrafos de 1 a 38, em que o refugo da cana de açúcar é combinado com bagaço da cana de açúcar durante a hidrólise (sacarificação) com a composição de enzima.

[40] O método do parágrafo 39, em que o bagaço da cana de açúcar é pré-tratado antes da sacarificação.

[00312] A invenção aqui descrita e reivindicada não deve ser limitada no escopo pelos aspectos específicos aqui divulgados, visto que estes aspectos são intencionados como ilustrações de vários aspectos da invenção. Qualquer

um dos aspectos equivalentes são intencionados a estar dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção além daquelas aqui mostradas e descritas tornar-se-ão evidentes a aqueles habilitados na técnica a partir da descrição precedente. Tais modificações também são intencionadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas. No caso de conflito, a presente divulgação incluindo as definições controlarão.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de degradar ou converter refugo de cana de açúcar, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) separar o refugo de cana de açúcar da cana de açúcar,

(ii) pré-tratar o refugo da cana de açúcar por pré-tratamento a vapor; e

(iii) sacarificar o refugo de cana de açúcar com uma composição de enzima para formar um produto de degradação ou um produto de conversão, a dita sacarificação realizada com sólidos totais de cerca de 5% a cerca de 50%.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o refugo de cana de açúcar é separado dos caules da cana de açúcar.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição de enzima compreende uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de uma celulase, polipeptídeos GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, hemicelulases, esterases, expansinas, lacases, enzimas ligninolíticas, pectinases, peroxidases, proteases e suoleninas.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o refugo de cana de açúcar degradado compreende um açúcar.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente recuperar o produto de degradação ou produto de conversão.

6. Método de produzir um produto de fermentação, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) colher e separar o refugo de cana de açúcar da cana de açúcar;

(b) pré-tratar o refugo de cana de açúcar por pré-tratamento a

vapor;

(c) sacarificar o refugo de cana de açúcar com uma composição de enzima, a dita sacarificação realizada com sólidos totais de cerca de 5% a cerca de 50%;

(d) fermentar o refugo de cana de açúcar sacarificado com um ou mais microrganismos de fermentação para produzir um produto de fermentação; e

(e) recuperar o produto de fermentação da fermentação, em que a dita sacarificação e a dita fermentação não são sacarificação simultânea e fermentação (SSF) ou sacarificação simultânea e cofermentação (SSCF).

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o refugo de cana de açúcar é separado dos caules da cana de açúcar.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a composição de enzima compreende uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de celulasas, polipeptídeos GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, hemicelulasas, esterases, expansinas, lacases, enzimas ligninolíticas, pectinases, peroxidases, proteases e suoleninas.

9. Método de produzir um produto de fermentação, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) sacarificar refugo pré-tratado de cana de açúcar com uma composição de enzima, o dito refugo de cana de açúcar pré-tratado tendo sido pré-tratado por pré-tratamento a vapor, e a dita sacarificação realizada com sólidos totais de cerca de 5% a cerca de 50%;

(b) fermentar o refugo de cana de açúcar sacarificado com um ou mais microrganismos de fermentação para produzir o produto de fermentação; e

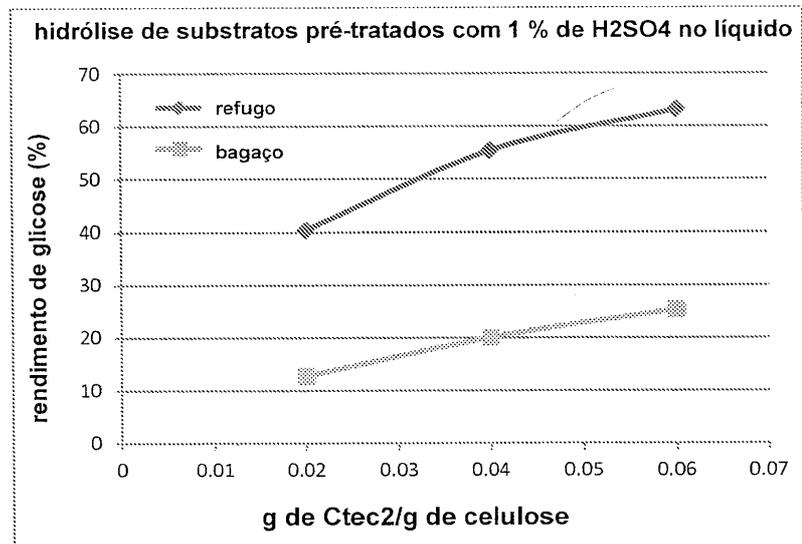
(c) recuperar o produto de fermentação da fermentação, em que a dita sacarificação e a dita fermentação não são sacarificação simultânea e fermentação (SSF) ou sacarificação simultânea e cofermentação (SSCF).

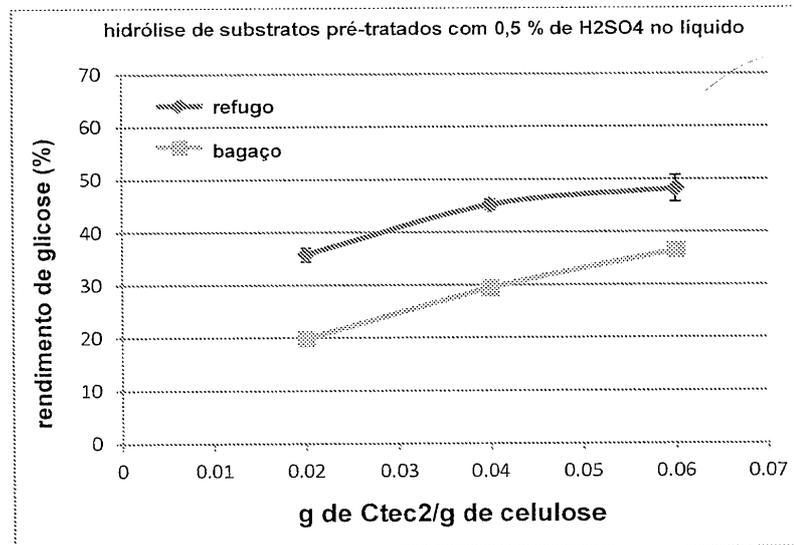
10. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o refugo de cana de açúcar é separado dos caules da cana de açúcar.

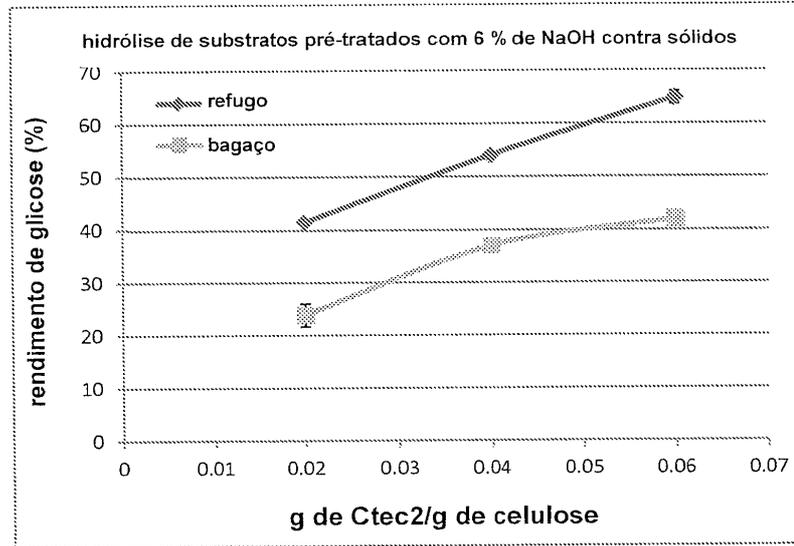
11. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a composição de enzima compreende uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste de celulasas, polipeptídeos GH61 que tem atividade realçadora celulolítica, hemicelulasas, esterases, expansinas, lacases, enzimas ligninolíticas, pectinases, peroxidases, proteases e suoleninas.

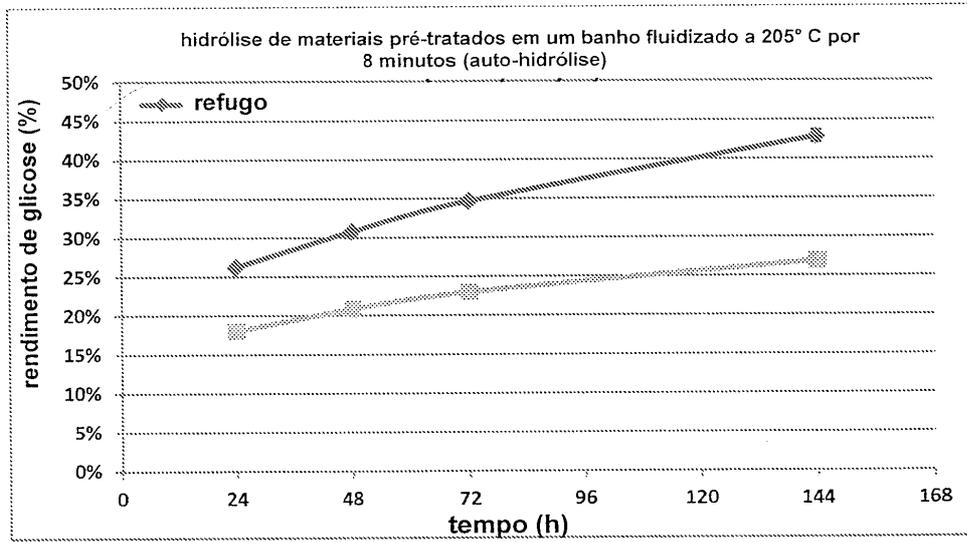
12. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende ainda combinar o dito refugo de cana de açúcar pré-tratado com bagaço de cana de açúcar antes ou durante a dita sacarificação.

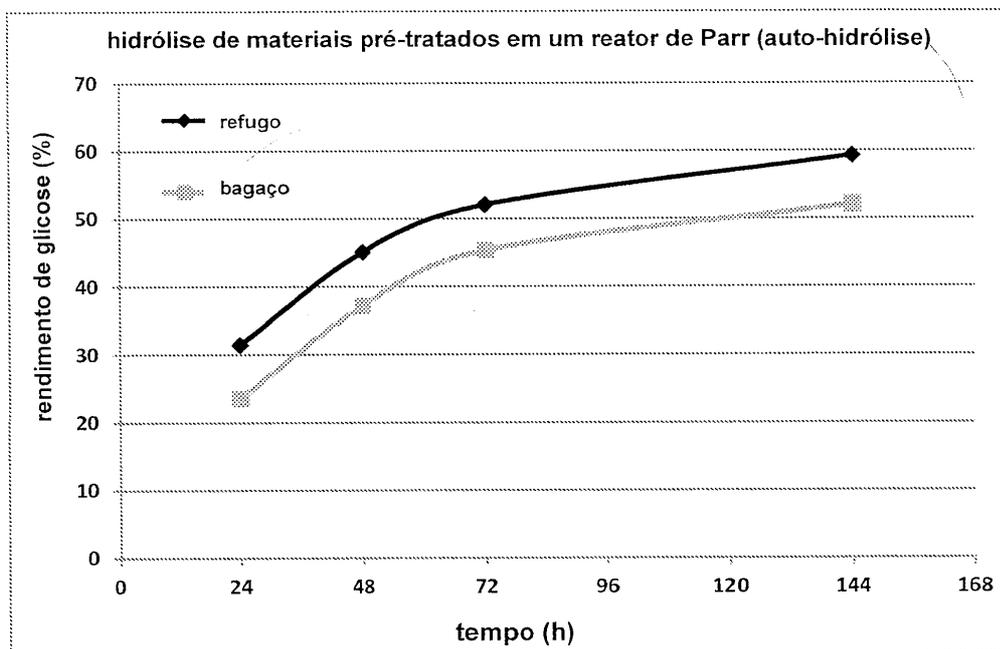
13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito bagaço de cana de açúcar foi pré-tratado sob condições de pH ácidas.

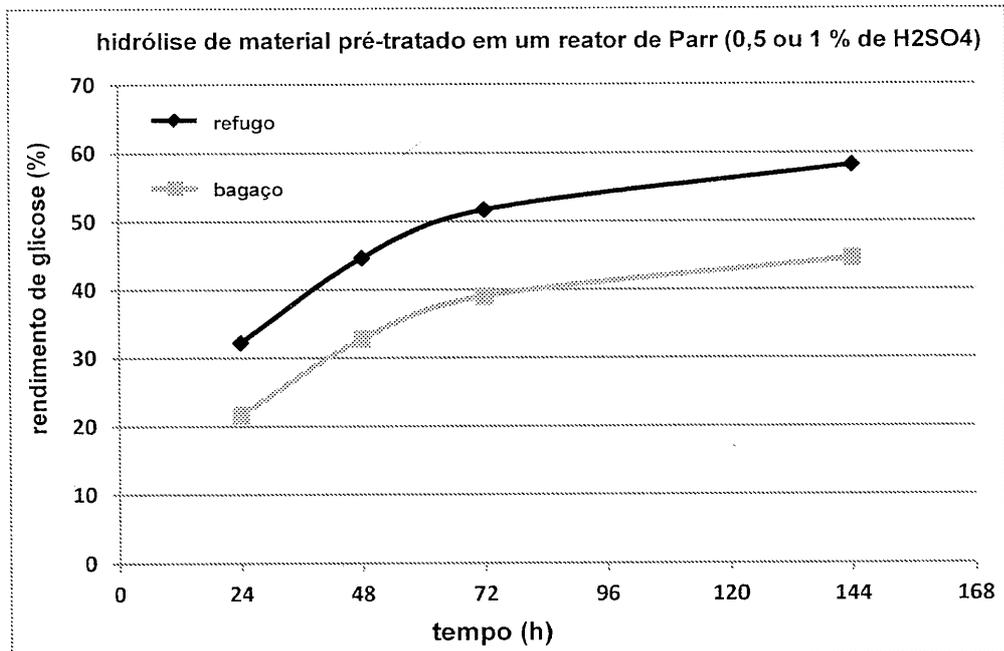
**Fig. 1**

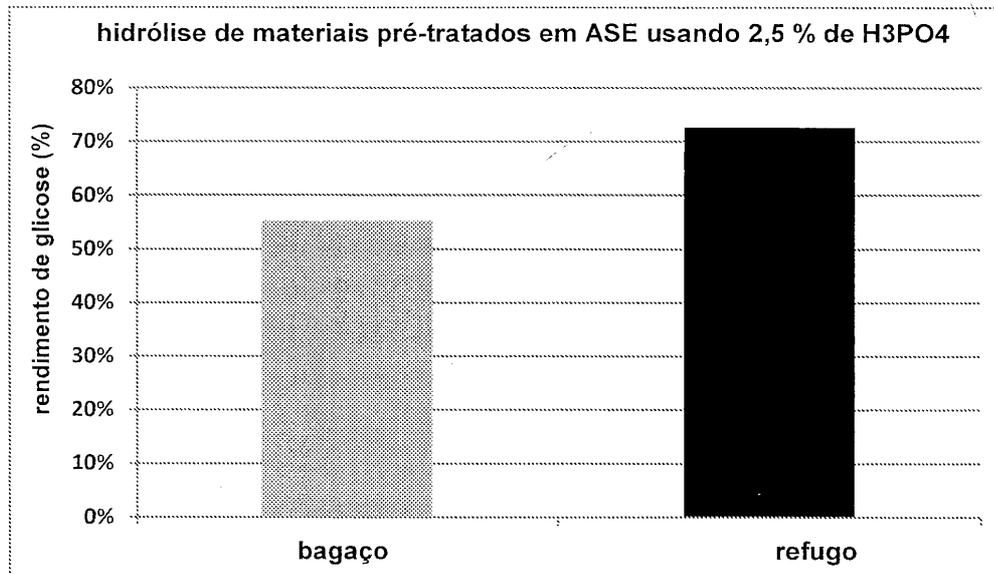
**Fig. 2**

**Fig. 3**

**Fig. 4**

**Fig. 5**

**Fig. 6**

**Fig. 7**