



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0609906-8 A2**



\* B R P I O 6 0 9 9 0 6 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 25/04/2006  
(43) Data da Publicação: 11/05/2010  
(RPI 2053)

(51) *Int.Cl.:*

C12N 9/42 (2010.01)  
C12N 15/62 (2010.01)  
C12N 15/63 (2010.01)  
C12N 15/80 (2010.01)  
C11D 3/386 (2010.01)  
D06M 16/00 (2010.01)  
A23K 1/165 (2010.01)

(54) Título: **PROTEÍNA DE FUSÃO DE CELULASE, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DETERGENTE CONTENDO A MESMA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, PROCESSOS PARA DESBOTAMENTO E PARA BIOACABAMENTO E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE FIBRA CELULÓSICA CONTENDO MATERIAL TÊXTIL, PARA TRATAR FIBRA OU POLPA DERIVADA DE MADEIRA E PARA MELHORAR A QUALIDADE DE RAÇÃO ANIMAL**

(57) Resumo: PROTEINA DE FUSÃO DE CELULASE, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DETERGENTE CONTENDO A MESMA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, PROCESSOS PARA DESBOTAMENTO E PARA BIOACABAMENTO E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE FIBRA CELULÓSICA CONTENDO MATERIAL TÊXTIL, PARA TRATAR FIBRA OU POLPA DERIVADA DE MADEIRA E PARA MELHORAR A QUALIDADE DE RAÇÃO ANIMAL. A presente invenção fornece novas proteínas de fusão de celulase, preparações de proteínas de fusão de celulase e composições de proteínas de fusão de celulase. A presente invenção se refere ainda a vetores de expressão de celulase, células hospedeiras expressando celulase e métodos para preparar tais vetores e células. Os usos de celulases, preparações de celulase e composições de celulase nas indústrias têxtil, de detergente, polpa e papel também são fornecidos.

(30) Prioridade Unionista: 29/04/2007 US 11/119,526,  
29/04/2007 FI 20055202, 29/04/2007 FI 20055202, 29/04/2007 US  
11/119,526

(73) Titular(es): AB ENZYMES OY

(72) Inventor(es): JARI VEHMAANPERÄ, JARNO KALLIO, LEENA VALTAKARI, MARIKA ALAPURANEN, MARJA PALOHEIMO, PENTTI OJAPALO, TERHI PURANEN

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT FI2006050161 de 25/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/117432de 09/11/2006

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**CELULASES MELHORADAS**".

Campo da invenção

5 A presente invenção se refere a novas proteínas de fusão celu-  
lase, preparações e composições contendo essas proteínas de fusão celula-  
se, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para sua prepara-  
ção e usos das celulases, preparações e composições nas indústrias têxtil,  
de detergente e polpa e papel.

Antecedentes da invenção

10 Celulose é um polissacarídeo linear de resíduos de glicose co-  
nectados por ligações  $\beta$ -1,4. Na natureza, celulose é geralmente associada  
com lignina juntamente com hemiceluloses, tais como xilanas e glicomana-  
nas. Enzimas celulolíticas hidrolisam a celulose e são produzidas por uma  
ampla variedade de bactérias e fungos. Celulases são enzimas industrial-  
15 mente importantes com um valor de mercado anual atual de cerca de 190  
milhões de dólares. Na indústria têxtil, celulases são usadas em acabamento  
de sarja de Nimes para criar uma aparência lavada de pedra segundo a mo-  
da em roupas de sarja de Nimes num processo de desbotamento, e elas  
também são usadas, por exemplo, para limpar flocos e prevenir a formação  
20 de pílulas na superfície de roupas de algodão. Na indústria de detergentes,  
celulases são usadas para clarificar corres e para prevenir o acinzentamento  
e a formação de pílulas das peças de roupa. Celulases são ainda usadas  
pela indústria de alimentos e de produção de ração animal, e elas têm um  
ótimo potencial na indústria de polpa e papel, por exemplo, na retirada de  
25 tinta para liberar tinta das superfícies da fibra e na melhoria da drenagem da  
polpa. O amplo espectro de usos industriais para celulases estabeleceu uma  
necessidade para produtos de celulase comerciais contendo diferentes com-  
ponentes de celulase e funcionando otimamente em diferentes faixas de pH  
e temperatura.

30 O uso prático de celulases é dificultado pela natureza das celu-  
lases conhecidas, as quais são geralmente misturas de celulases com uma  
variedade de atividades e especificidades de substrato. Por essa razão, tem

sido feitos esforços para obter celulases com somente as atividades desejadas. As propriedades únicas de cada celulase tornam algumas mais adequadas para certos propósitos do que outras. Enquanto as enzimas diferem numa variedade de formas, uma das mais importantes diferenças é o pH 5 ótimo. Celulases neutras são mais ativas na faixa de pH 6 - 8 e celulases alcalinas na faixa de pH 7,5 - 10, enquanto que celulases ácidas, com o pH ótimo em pH 4,5 - 5,5, apresentam níveis de atividade muito baixos em valores de pH mais altos. Celulases neutras e ácidas são especialmente úteis na indústria têxtil. No tratamento têxtil, as celulases atacam as cadeias de moléculas de celulose que formam as fibras de algodão, afetando dessa forma 10 as características do tecido.

Na indústria têxtil, aparência de "pedra lavada" ou uma aparência abradada tem sido interessante para os produtores de sarja nos anos recentes. A lavagem de pedra tradicional com pedras de pedra-pomes reduz 15 a força do tecido e carrega os aparelhos de lavagem. A tendência tem sido para processos de acabamento de sarja de Nimes enzimáticos e celulases foram substituídas ou tem sido usadas juntamente com pedra-pomes para conferir ao tecido sua aparência "gasta" desejada. O tratamento enzimático controlado resulta em menos danos para as peças de vestuário e máquinas e elimina a necessidade pelo descarte de pedras. 20

Celulases aplicadas no tratamento de sarja de Nimes são geralmente divididas em dois grupos principais: celulases ácidas e neutras. Celulases ácidas tipicamente operam em pH 4,5 - 5,5 e as celulases neutras na faixa de pH 6 - 8. Celulases ácidas usadas em desbotamento principalmente se originam da *Trichoderma reesei* (forma sexual da *Hypocrea jecorina*) e as 25 celulases neutras vêm de uma variedade de fungos, incluindo os gêneros de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Chrysosporium* (Haakana *et al.* 2004). Enzimas *T. reesei* incluem, por exemplo, celulases da família de glicosídeos 5 (endoglucanase II, EGII), família 7 (celobioidrolase I, CBHI) e família 12 (endoglucanase III, EGIII; Ward *et al.* 1993) e as celulases neutras, mais comumente endoglucanases, da família 30 45 e da família 7 (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993).

Celulases compreendem um domínio/núcleo catalítico (CD) expressando atividade da celulase. Além do domínio catalítico, a molécula de celulase pode compreender um ou mais domínios de ligação de celulose (CBDs), também chamados de domínios/módulos de ligação de carboidratos (CBD/CBM), os quais podem estar localizados ou no N- ou no C- terminal do domínio catalítico. CBDs têm atividade de ligação a carboidrato e eles medeiam a ligação da celulase para a celulose cristalina, mas têm pouco ou nenhum efeito na atividade hidrolítica da celulase da enzima em substratos solúveis. Esses dois domínios estão tipicamente conectados através de uma região ligante flexível e altamente glicosilada.

Celulases que atacam primariamente na superfície da fibra são especialmente úteis na lavagem com pedra de sarja de Nimes pintada com corante índigo, uma vez que o corante é localizado na superfície da fibra. Quando usado para tratar tecido de algodão, celulases neutras geralmente requerem um tempo de lavagem mais longo do que as celulases ácidas. Entretanto, celulases neutras têm uma ação menos agressiva no algodão do que celulases ácidas, e não afetam a força do tecido tanto quanto as celulases ácidas. Celulases neutras têm um perfil de pH mais amplo e, dessa forma, o aumento no pH que ocorre durante o desbotamento tem pouco efeito na atividade das enzimas de celulase neutras. Entretanto, uma vez que os tratamentos da celulase também tem efeitos indesejáveis, tais como dano de fibras ou perda de força, um equilíbrio adequado entre os efeitos desejados e indesejáveis tem que ser procurado.

WO97/14804, o qual é aqui incorporado por referência, revela três novas celulases neutras de origem *Melanocarpus*, as quais são especialmente úteis na indústria têxtil e de detergente. Especificamente, uma endoglucanase de 20 KDa (Cel45A), uma endoglucanase de 50 KDa (Cel7A) e uma celobioidrolase de 50 KDa (Cel7B) são descritas. Essas celulases aqui designadas como "celulase 20K", "celulase 50K" e "celulase 50K B", respectivamente, são derivadas de *Melanocarpus albomyces* e mostram bons efeitos de lavagem de pedra.

Uma vez que há uma demanda existente, especialmente na in-

dústria têxtil e detergente, para outras celulases melhoradas, foi sugerido que melhorias nas celulases poderiam ser obtidas pela formação de proteínas de fusão. Também na WO97/14804, constructos de proteína de fusão da celulase 20K, celulase 50K e celulase 50K B com, por exemplo, celulase, hemicelulase ou manase de *Trichoderma reesei* ou seus domínios funcionais são geralmente sugeridos. Além disso, para criar novas propriedades para as celulases reveladas, fusões das celulases reveladas com domínios, tais como o domínio de ligação da celulose (CBD), preferivelmente com seu ligante, são sugeridas. Entretanto, nenhum exemplo específico é dado, nem são descritas as novas propriedades tencionadas para.

Proteínas de fusão de celulase são adicionalmente conhecidas, por exemplo, a partir de WO96/29397, que revela endoglucanases formadas por uma fusão entre endoglucanases de *Myceliophthora thermophila*, de *Macrophomina phaseolina* e de *Crinipellis scabella* e o CBD/ligante de *Humicola insolens*. As referidas endoglucanases na sua forma natural não têm um CBD/ligante.

EP 663 950 revela variantes de celulase, especialmente variantes de celulase de *Humicola insolens* de 43 KDa, em que a celulase pode incluir uma região ligante de outra espécie de microrganismo, por exemplo, para proporcionar propriedades melhoradas, tais como resistência melhorada a tensoativos aniônicos, à oxidação ou aos agentes alvejantes. Entretanto, há uma necessidade contínua por celulases melhoradas que também são menos danosas à fibra na indústria têxtil e em outros campos, onde celulases tradicionalmente são usadas. Particularmente há uma necessidade contínua por celulases mais eficientes para melhorar a economia do processo.

A presente invenção almeja atender a essa necessidade.

#### Breve descrição da invenção

Um objeto da presente invenção é fornecer novas proteínas de fusão de celulase com propriedades hidrolíticas melhoradas para uso na indústria têxtil, especialmente na lavagem de pedra de sarja de Nimes, e para uso nas composições detergentes assim como em outros campos. As novas

proteínas de fusão de celulase da invenção são ativas em valores de pH neutro e alcalino, elas têm um desempenho de lavagem muito melhorado em aplicações de desbotamento e bioacabamento têxtil e em aplicações de detergentes, e elas ainda não comprometem a força dos tecidos. Com a eficiência melhorada das proteínas de fusão da celulase, o processo de produção das enzimas é significativamente mais econômico. Vantagens adicionais também são alcançadas em termos de logística e na estocagem dos produtos de enzima, quando quantidades menores de produto de enzima são necessárias.

10 Um outro objeto da presente invenção é fornecer polinucleotídeos que codificam as novas proteínas de fusão de celulase das presentes invenções.

Um outro objeto da presente invenção é fornecer novos plasmídeos ou vetores de expressão contendo tais polinucleotídeos, úteis para a produção de novas proteínas de fusão de celulase da presente invenção, e novos hospedeiros transformados com os respectivos plasmídeos de expressão.

15 Um outro objeto da presente invenção é fornecer preparações enzimáticas, as quais contêm uma ou mais novas proteínas de fusão de celulase com propriedades hidrolíticas melhoradas.

20 Ainda um outro objeto da presente invenção é fornecer métodos de uso de preparações enzimáticas e as proteínas de fusão de celulase para acabamento de tecidos, especialmente para o desbotamento de sarja de Nimes.

25 Ainda um outro objeto da presente invenção é fornecer meios para o uso de preparações enzimáticas da invenção em composições de detergente.

A presente invenção se refere a uma nova proteína de fusão de celulase compreendendo

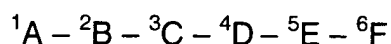
30 A. uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e

B. uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente mo-

dificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação de celulose (CBD) derivado de outra espécie,

em que uma região de junção foi introduzida entre a referida primeira seqüência de aminoácidos e a referida segunda seqüência de aminoácidos, por meio da qual uma proteína de fusão estável é obtida.

Preferivelmente, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

${}^1A$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^1A$  é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

${}^2B$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente  ${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

${}^3C$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente  ${}^3C$  é Ile;

${}^4D$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^4D$  é Gly ou Pro;

${}^5E$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente  ${}^5E$  é Ser; e

${}^6F$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente  ${}^6F$  é Ser ou está ausente; em que  ${}^1A$  está ligado na seqüência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e  ${}^6F$  está ligado na seqüência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

A presente invenção ainda se refere a um vetor de expressão compreendendo uma primeira seqüência de polinucleotídeo que codifica uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e uma segunda seqüência de polinucleotídeos que codifica uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação de celulose (CBD) derivado de outras espécies, e um polinucleotídeo que codifica uma região de junção que conecta as referidas primeira e segunda seqüência de polinucleotídeo, as referidas seqüências de polinucleotídeo codifican-

do as respectivas seqüências de aminoácidos das proteínas de fusão de celulase da invenção.

A presente invenção ainda se refere a novos hospedeiros transformados com os vetores da invenção, especialmente hospedeiros que são capazes de um alto nível de expressão da proteína de fusão de celulase da invenção.

A presente invenção se refere ainda a uma preparação enzimática, a qual contém uma ou mais proteínas de fusão de celulase da invenção.

A presente invenção se refere ainda a um método para o uso das preparações enzimáticas da invenção para o acabamento de tecidos, especialmente para o desbotamento de sarja de Nimes.

A presente invenção se refere ainda ao uso das preparações enzimáticas da invenção em composições de detergente.

#### Desenhos

Fig. 1 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1480.

Fig. 2 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK492.

Fig. 3 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK424.

Fig. 4 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1237.

Fig. 5 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1241.

Fig. 6 é o mapa esquemático do plasmídeo p3SR2.

Fig. 7 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1649.

Fig. 8 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1694.

Fig. 9A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 20K+CBD. O gene 20K+CBD estava sob o controle do promotor *cbh1* (*cel7A*) (*cbh1 prom*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso da seqüência terminadora *cbh1* (*termo*). O gene *amdS* (*amdS*) e a região flanqueadora *cbh1* 3' (flanqueadora *cbh1* 3') foram incluídos. figura 9B. Seqüência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) é fundida com o peptídeo ligante CBHI de *Trichoderma reesei* (*cel7A*) seguido pelo domínio de ligação de celulose (CBD) em plasmídeos pALK1434 e pALK1435. Os aminoácidos contidos na

região ligante estão sublinhados, e a seqüência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Fig. 10A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 20K+CBD. O gene 20K+CBD estava sob o controle do promotor *cbh1* (*cel7A*) (*cbh1 prom*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso da seqüência terminadora *cbh1* (termo). O gene *amdS* (*amdS*) e a região flanqueadora *cbh1* 3' (flanqueadora *cbh1* 3') foram incluídos. figura 10B. Seqüência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) é fundida com o peptídeo ligante CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido pelo domínio de ligação de celulose (CBD) em plasmídeos pALK1768, pALK1769, pALK1770 e pALK1775. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a seqüência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Fig. 11A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 20K+CBD<sub>mut</sub>. O gene 20K+CBD<sub>mut</sub> estava sob o controle do promotor *cbh1* (*cel7A*) (*cbh1 prom*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso da seqüência terminadora *cbh1* (termo). O gene *amdS* foi incluído como o marcador de transformação. figura 11B. Seqüência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) é fundida com o peptídeo ligante CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido pelo domínio de ligação de celulose (CBD). As plasmídeos pALK1768, pALK1769, pALK1770 e pALK1775. Os aminoácidos substituições de aminoácidos na região CBD dos cassetes de expressão pALK1877 - pALK1880 também estão apresentadas. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a seqüência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido e os resíduos de tirosina de suas substituições na região CBD estão indicados por números sobrescritos.

Fig. 12A. Seqüência de aminoácidos do peptídeo de ligação in-

terdomínio da CBHI de *T. reesei* (Cel7A). Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados.  $\Delta$ G-444 e  $\Delta$ G-460 representam a anulação do ligante dos resíduos 434 - 444 e 434 - 460, respectivamente. figura 12B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína 20L de *Melanocarpus albomyces* está fundida com o peptídeo ligante cortado da CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido pelo domínio de ligação à celulose intacto ou modificado (CBD) nos cassetes de expressão pALK1893, pALK1896, pALK1899 e pALK1952. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada por itálico. O primeiro aminoácido e os resíduos de tirosina ou suas substituições na região CBD estão indicados por números sobrescritos.

Fig. 13A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 50K+CBD. O gene 50K+CBD está sob o controle do promotor *cbh1* (*cbh1 prom*) de *T. reesei* e a terminação da transcrição é assegurada com a adição do terminador *cbh1* (termo). O gene *amdS* (*amdS*) e a região flanqueadora *cbhl 3'* (*cbhl 3'*) são incluídas. figura 13B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção da 50K de *M. albomyces* ligado ao ligante CBHI + CBD de *T. reesei*. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Fig. 14A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 50KB+CBD. O gene 50KB+CBD está sob o controle do promotor *cbh1* (*cbh1 prom*) de *T. reesei* e a terminação da transcrição é assegurada com a adição do terminador *cbh1* (termo). O gene *amdS* (*amdS*) e a região flanqueadora *cbhl 3'* (*cbhl 3'*) são incluídas. figura 14B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção da 50KB de *M. albomyces* ligado ao ligante CBHI + CBD de *T. reesei*. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Fig 15A. O cassete de expressão usado na transformação de

protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão C-BHI + CBD recombinantes de *Thermoascus aurantiacus*. O gene CBHI+CBD estava sob o controle do promotor *cbh1* (*cbh1 prom*) (*cel7A*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso da seqüência terminadora (termo). O gene *amdS* foi incluído como um marcador de transformação. figura 15B. Seqüência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína CBHI de *Thermoascus aurantiacus* é fundida com o peptídeo ligante da CBHI de *Trichoderma reesei* seguido pelo domínio de ligação à celulose (CBD). Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a seqüência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Fig. 16. O desempenho das cepas RF5977 e RF6090 expressando proteínas de fusão da invenção em comparação com uma preparação comercial 20K no tratamento de sarja de Nimes. O aumento da claridade como uma função da dosagem enzimática em condições de lavagem está descrito nos Exemplos 8 e 9.

Fig. 17. Efeito das proteínas de fusão cbd + 20k e as correspondentes preparações enzimáticas comerciais na força do tecido de sarja de Nimes. figura 17A. Força de rasgo (N), deformação. figura 17B. Força de rasgo (N), tecido.

Fig. 178 mostra o efeito remoção de pilling da proteína de fusão cbd + 20k.

Fig. 19 ilustra o desempenho da proteína de fusão 20K+CBD na aplicação de detergente. A figura mostra a diferença de parelhamento de cor entre o artigo anti-acinzentamento 224 lavado com ou sem a enzima, e o artigo original (não-lavado); A. a 40°C e B. a 60°C.

Fig. 20 ilustra o desempenho da proteína de fusão 20K+CBD na aplicação de detergente. A figura mostra a diferença de parelhamento de cor entre o artigo anti-acinzentamento 224 lavado com enzima e sem enzima; A. a 40°C e B. a 60°C.

#### Descrição detalhada da invenção

A presente invenção é baseada em esforços para melhorar mais

celulases neutras, particularmente aquelas descritas em WO97/14804, objetivando a redução da perda de força no tecido no tratamento enzimático. Em algumas aplicações, a celulase 20K mostrou propriedades indesejáveis em relação à força da fibra, possivelmente devido ao pequeno tamanho. A hipótese simples foi a de que um aumento no tamanho da enzima poderia reduzir a capacidade da enzima de penetrar nas fibras, enfraquecendo dessa forma as fibras para uma extensão menor, isto é, a enzima poderia ser menos agressiva. Para fazer isso, a tentativa de proteína de fusão sugerida em WO97/14804 foi usada, e constructos de fusão contendo um núcleo de celulase neutra de uma espécie *Melanocarpus* e uma cauda consistindo em um ligante/CBD de uma celobioidrolase ácida I de *T. reesei* foram projetados. Surpreendentemente, entretanto, ao contrário das sugestões da técnica anterior, constructos de proteína de fusão completamente estáveis não puderam ser obtidos, nas os parceiros de fusão separados um do outro nas condições de cultivo. Isso foi presumivelmente devido à presença de protease(s).

Para produzir as proteínas de fusão estáveis, uma tentativa foi projetar novos constructos de junção sem ter aminoácidos hidrofóbicos adjacentes (por exemplo, V, I, L, F e W) para prevenir a clivagem por aspartiloproteases. Entretanto, embora os constructos produzissem proteínas de fusão, ocasionalmente foi observada alguma degradação.

Baseando-se no alinhamento das celulases neutras contendo naturalmente uma cauda de ligante/CBD, outros constructos foram produzidos e finalmente esses constructos provaram ser mais estáveis e mais úteis para testagem adicional. Além disso, constructos de fusão foram projetados os quais carregaram mutações no CBD resultando em afinidade ou adsorção reduzida ou mínima para a celulose (Linder *et al.*, 1995).

Os novos constructos produziram propriedades de força melhoradas, como foi o objetivo. Surpreendentemente, as proteínas de fusão de celulase estáveis apresentaram adicionalmente melhoria não-esperada no desempenho de lavagem, e foram tão altas quanto mesmo seis vezes tão eficientes quanto suas celulases "de origem". Entretanto, os rendimentos de

produção foram mantidos acerca do mesmo nível. Isso significa que somente um sexto da quantidade de atividade de celulase presentemente necessária é suficiente para alcançar o mesmo desempenho de lavagem da celulase da técnica anterior. Isso produz economias consideráveis no passo de produção, e também na logística e estocagem, diminuindo dessa forma a carga ambiental. Também os efeitos indesejáveis das preparações de celulase são reduzidos, causando dessa forma economias adicionais para os usuários finais do produto enzimático. Considerando que cerca de 2 bilhões de pares de calças jeans são produzidos anualmente, e a maior parte deles é finalizada com celulase, a vantagem é altamente significativa.

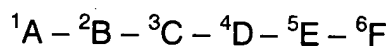
Concordantemente, a presente invenção fornece uma nova proteína de fusão de celulase, compreendendo

A. uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e

B. uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação de celulose (CBD) derivado de outra espécie,

em que uma região de junção foi introduzida entre a referida primeira seqüência de aminoácidos e a referida segunda seqüência de aminoácidos, por meio da qual uma proteína de fusão estável é obtida.

Em uma modalidade preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

<sup>1</sup>A é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente <sup>1</sup>A é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

<sup>2</sup>B é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente <sup>2</sup>B é Pro, Gln, ou Glu;

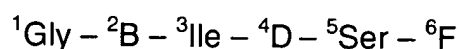
<sup>3</sup>C é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente <sup>3</sup>C é Ile;

<sup>4</sup>D é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente <sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

<sup>5</sup>E é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente <sup>5</sup>E é Ser; e

<sup>6</sup>F é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente <sup>6</sup>F é Ser ou está ausente; em que <sup>1</sup>A está ligado na seqüência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e <sup>6</sup>F está ligado na seqüência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

Em uma modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

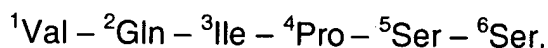
<sup>2</sup>B é Pro, Gln, ou Glu;

<sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

<sup>5</sup>E é Ser; e

<sup>6</sup>F é Ser ou está ausente.

Em outra modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



Em outra modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



Em outra modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



Em uma modalidade preferida da invenção, a primeira seqüência de aminoácidos é de uma celulase neutra e a segunda seqüência de aminoácidos é de uma celulase ácida.

Em outra modalidade preferida da invenção, a primeira seqüência de aminoácidos é de uma celulase da família 45 (Cel 45) e a segunda seqüência de aminoácidos é da celulase da família 7 (Cel 7).

Conforme usado no presente contexto, a expressão "núcleo de celulase" ou "núcleo" significa o domínio/núcleo catalítico (CD) de uma enzima expressando atividade da celulase. Tal domínio catalítico pode estar na

sua forma de ocorrência natural (isto é, intacto) ou, preferivelmente, estar modificado conforme definido abaixo. As expressões "derivado" e variante funcional denotam polipeptídeos expressando a mesma atividade da celulase, mas incluindo modificações conforme definido abaixo.

5                   No presente contexto, códigos de aminoácidos de uma letra e códigos de aminoácido de três letras convencionais são usados. Conseqüentemente, A e Ala denotam alanina, R e Arg denotam arginina, N e Asn denotam asparagina, D e Asp denotam ácido aspártico, Cys e C denotam cisteína, E e Glu denotam ácido glutâmico, Q e Gln denotam glutamina, G e Gly denotam glicina, H e His denotam histidina, I e Ile denotam isoleucina, L 10 e Leu denotam leucina, K e Lys denotam lisina, Me Met denotam metionina, F e Phe denotam fenilalanina, P e Pro denotam prolina, S e Ser denotam serina, T e Thr denotam treonina, W e Trp denotam triptofano, Y e Tyr denotam tirosina e V e Val denotam valina. Além de L-aminoácidos de ocorrência 15 natural, D-aminoácidos também poderiam ser usados.

Nas proteínas de fusão de celulase da invenção, a celulase neutra é preferivelmente de origem fúngica. A celulase neutra pode ser derivada do gênero de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, 20 *Talaromyces*, ou *Chaetomium*. São especialmente preferidas as *Melanocarpus sp.*, com *Melanocarpus albomyces* sendo especialmente preferida. A celulase ácida usada nas proteínas de fusão da celulase da invenção foram originadas de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, especialmente de *Trichoderma reesei*.

25                   Numa modalidade especificamente preferida da invenção, a primeira seqüência de aminoácidos é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 ou um derivado seu, e a segunda seqüência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* da SEQ ID NO: 4 ou um derivado seu.

30                   Numa modalidade preferida da invenção, as proteínas de fusão de celulase contêm modificações no núcleo da celulase e/ou no ligante e/ou CBD. Conforme usado no presente contexto, a expressão "modificado" se

refere a mutações, tais como inserção ou substituição de um ou mais aminoácidos, ou outras modificações, tais como glicosilações. Exemplos de tais mutações incluem a substituição de resíduos de tirosina conservados nas posições 31 (correspondendo à tirosina Y492 do polipeptídeo maduro) e/ou 5 32 (correspondendo à tirosina Y493 do polipeptídeo maduro) com um aminoácido alifático, preferivelmente com alanina, e/ou com um aminoácido aromático, tal como triptofano, de CBD ou CBHI de *Trichoderma reesei* conforme descrito por Linder *et al.* 1995. Outros exemplos de tais mutações incluem mutações interligantes de CBHO de *Trichoderma reesei* conforme descrito por Srisodsuk *et al.*, 1993, tais como anulações de aminoácidos da 10 posição 434 até a 444 e da posição 434 até a 460 da seqüência de CBHI de *Trichoderma* maduro. Outros exemplos de tais mutações incluem a anulação da Ala na posição 207, a anulação da Va na posição 208, a substituição da Phe209Trp e a inserção de Pro depois da posição 206 na seqüência de 20K 15 celulase de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2.

As proteínas de fusão da celulase da invenção são estáveis. No contexto da presente invenção, a expressão "proteína de fusão de celulase estável" significa que pelo menos 20%, preferivelmente pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente 90 - 100% da 20 proteína de fusão de celulase produzida contém uma região de junção não-clivada entre as seqüências de aminoácidos durante a fermentação. Isso significa que 20% - 100%, preferivelmente 40% - 100%, mais preferivelmente 70% - 100% da celulase produzida tem a primeira e a segunda seqüência de aminoácidos unidas por fusão. A expressão "proteína de fusão de celula- 25 se estável" significa adicionalmente que o preparo da proteína de fusão de celulase pode ser estável como tal ou foi estabilizado, por exemplo, por tratamento com calor ou pelo ajuste do pH ou pela adição de estabilizantes ou agentes que reduzem a atividade da protease ou pela separação da proteína de fusão da cultura. O tratamento com calor no presente contexto significa 30 um tratamento numa temperatura a qual permita que a proteína de fusão na preparação seja mantida adequadamente estável. O tratamento com calor pode ser, por exemplo, um tratamento no pH 6,0 a 65 °C por 60 a 70 minu-

tos.

No presente contexto, a expressão "proteína de fusão intacta" significa que a junção entre a primeira e a segunda seqüência de aminoácidos na proteína de fusão da invenção permanece não quebrada, embora  
5 possa ou não aparecer degradação terminal nas referidas seqüências.

Numa modalidade preferida da proteína de fusão da celulase da invenção, a primeira seqüência de aminoácido é uma seqüência 20K de *Melanocarpus albomyces* com SEQ ID NO: 2 ou uma variante funcional sua. Em outra modalidade preferida da primeira seqüência de aminoácido é a  
10 seqüência 50K de *Melanocarpus albomyces* com a SEQ ID NO: 6 ou uma variante funcional sua. Em outra modalidade preferida da primeira seqüência de aminoácidos é a seqüência 50KB de *Melanocarpus albomyces* com a SEQ ID NO: 8 ou uma variante funcional sua. Em outra modalidade preferida da primeira seqüência de aminoácidos é a seqüência da CBHI de *Thermo-*  
15 *ascus aurantiacus* com SEQ ID NO: 10 ou uma variante funcional sua. Em ainda uma modalidade preferida da proteína de fusão de celulase da invenção, a segunda seqüência de aminoácidos é o ligante e a seqüência de domínio de ligação da celulase com SEQ ID NO: 4 da celobiodrolase I de *Trichoderma reesei* ou uma variante funcional sua.

20 Dessa forma, uma modalidade altamente preferida da proteína de fusão da celulase da invenção, a primeira seqüência de aminoácidos do núcleo de celulase é selecionada da SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43, especialmente SEQ ID. NO: 39, e a segunda seqüência de aminoácidos de uma seqüência ligante e/ou CBD é selecionada de SEQ ID. NO: 44, 45, 46,  
25 47, 48, 49 e 50. Numa modalidade especial da invenção, a primeira seqüência de aminoácidos do núcleo de celulase é a SEQ ID NO: 39 e a segunda seqüência de aminoácidos de uma seqüência ligante e/ou CBD é a SEQ ID NO: 47, 49 ou 50.

A presente invenção ainda se refere a um veto de expressão  
30 compreendendo uma primeira seqüência de polinucleotídeo codificando uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e uma segunda seqüência de polinu-

cleotídeo codificando uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação à celulose (CBD) derivado de outra espécie, e um polinucleotídeo codificando uma região de junção específica conectando as referidas primeira e segunda seqüências de polinucleotídeo, as referidas seqüências de polinucleotídeo codificando as respectivas seqüências de aminoácidos conforme especificamente definido acima.

A presente invenção se refere ainda a preparações de celulase contendo uma ou mais proteínas de fusão de celulase da invenção, sozinhas ou juntas com enzimas adicionais e aditivos de acordo com a aplicação especial em questão.

A presente invenção se refere ainda aos usos de e métodos para o uso das preparações de proteína de fusão de celulase da invenção para os propósitos especificamente revelados abaixo.

As preparações de proteína de fusão de celulase da invenção são especialmente úteis na indústria têxtil e detergente. Essas celulases apresentam um efeito de abrasão altamente melhorado e visível e um aumento da claridade mensurável. Eles apresentam um manchamento de fundo aceitável e bom, assim como um contraste focado em desbotamento. Eles são úteis na indústria têxtil para o bioacabamento de tecidos ou peças de vestuário, por exemplo, remoção de pilling, desfloculação, clarificação de cor, redução de aspereza, criação de diferentes acabamentos (por exemplo, um efeito de "pele de pêssego", "usado", "lavado em areia" ou "aparência antiga") e para o bioacabamento de fio, por exemplo, redução do excesso de pêlos e melhoria da maciez. Ter tais boas propriedades remoção de pilling é muito incomum para celulases neutras, uma vez que as enzimas usadas nas aplicações de bioacabamento industrial são tipicamente celulases ácidas. Celulase neutra com excelentes propriedades remoção de pilling como a proteína de fusão cbd + 20k capacita o tratamento de bioacabamento simultaneamente durante a tintura, levando a economias consideráveis. Também a firmeza de cor é geralmente melhor em condições neutras do que em ácidas.

Usos adicionais incluem o uso em composições detergentes para melhorar as propriedades de cuidado de tecido por antipilling, anti-acinzentamento, clarificação de cor e amaciamento, e para melhorar o efeito de limpeza têxtil, por exemplo, remoção de manchas.

5 Conforme utilizado no presente contexto, a expressão "desbotamento" de tecido ou peça de vestuário significa o uso de enzimas no lugar de, ou além de, pedra-pomes para o tratamento de tecido ou vestuário, especialmente sarja de Nimes.

10 Conforme utilizado no presente contexto, a expressão "bioacabamento" se refere ao uso de enzimas numa hidrólise controlada de fibras celulósicas para modificar a superfície do fio ou tecido de uma forma que previna permanentemente o pilling, melhore o manuseio de tecido como maciez e lisura, limpe a estrutura da superfície pela redução da flocosidade, o que resulta na clarificação de cores, melhora a capacidade de prender do  
15 tecido, melhora a capacidade de absorção de umidade, o que pode melhorar também a capacidade de coloração.

Conforme utilizado no presente contexto, a expressão "backstaining" se refere à tendência de o corante liberado redepositar na superfície das fibras do tecido.

20 Conforme usado no presente contexto, a expressão "detergente" se refere a um agente de limpeza que pode conter agentes ativos de superfície (tensoativos aniônico, não-iônico, catiônico e anfótero), abrasivos e outros ingredientes opcionais, tais como agentes anti-redeposição e de suspensão de manchas, clarificadores óticos, agentes alvejantes, corantes e  
25 pigmentos e hidrolases. Uma listagem adequada dos conteúdos de detergentes é dada na Patente Americana No. 5.433.750, uma lista adequada de tensoativos é dada na Patente Americana No. 3.664.961.

Por uma seqüência de aminoácido que é um "equivalente" ou um "derivado" de uma seqüência de aminoácido específica se entende uma  
30 seqüência de aminoácido que não é idêntica à seqüência de aminoácido específica, mas antes contém pelo menos algumas alterações de aminoácidos (anulações, substituições, inversões, inserções, etc.) que não necessa-

riamente afetam a atividade biológica da proteína em comparação com uma atividade similar da seqüência de aminoácido específica, quando usada para uma dada aplicação.

5 A atividade biológica de uma celulase é a sua atividade catalítica, e/ou sua capacidade de se ligar ao material celulósico.

Um vetor de expressão é um plasmídeo de clonagem ou um vetor capaz de expressar DNA que codifica as proteínas de fusão de celulase da invenção após a transformação num hospedeiro desejado. Quando um hospedeiro fúngico é usado, o gene de interesse é preferivelmente fornecido a um hospedeiro fúngico como parte de um veículo de expressão ou clonagem que se integra no cromossomo fúngico, ou permite que o gene de interesse se integre no cromossomo hospedeiro, ou como um plasmídeo que se replica autonomicamente. Seqüências que são parte do veículo de clonagem ou do veículo de expressão também podem estar integradas com o referido DNA durante o processo de integração. Além disso, no fungo o vetor de expressão ou suas partes podem ser alvejadas em locais predeterminados.

O DNA que codifica as proteínas de fusão da invenção é também preferivelmente colocado sob o controle de (isto é, operativamente ligado a) certas seqüências de controle, tais como seqüências promotoras fornecidas pelo vetor (a qual se integra com o gene de interesse). Alternativamente, as seqüências de controle podem ser aquelas no sítio de inserção.

As seqüências de controle de expressão de um vetor de expressão irá variar dependendo se o vetor é projetado para expressar certo gene num hospedeiro procariótico ou num eucariótico (por exemplo, um vetor para lançamento pode fornecer um gene para seleção em hospedeiros bacterianos). Seqüências de controle de expressão podem conter elementos regulatórios transcricionais tais como promotores, elementos intensificadores e seqüências de terminação transcricionais, e/ou elementos regulatórios traducionais, tais como de iniciação traducional e sítios de terminação.

30 Uma molécula de polinucleotídeo, tal como DNA, é dita como sendo "capaz de expressar" um polipeptídeo se ele contiver seqüências de controle de expressão as quais contêm informação regulatória transcricional

e tais seqüências são "operavelmente ligadas" à seqüência de nucleotídeo a qual codifica o polipeptídeo.

Uma ligação operável é uma ligação na qual a seqüência é conectada a uma seqüência (ou seqüências) regulatória de tal forma a colocar a expressão da seqüência sob a influência ou controle da seqüência regulatória. Duas seqüências de DNA (tal como uma seqüência da região promotora ligada à extremidade 5' da seqüência codificador de proteína) são ditas como sendo operavelmente ligadas em função dos resultados do promotor na transcrição.

Os vetores da invenção podem ainda compreender outros elementos regulatórios operativamente ligados, tais como seqüências intensificadoras.

Numa modalidade preferida, transformantes geneticamente estáveis são construídos por meio dos quais o DNA que codifica as proteínas de fusão da celulase da invenção está integrado no cromossomo do hospedeiro pela transformação com um vetor, o qual abriga seqüências que promovem a integração do referido vetor no cromossomo.

Células que têm DNA estavelmente integrado que codifica as proteínas de fusão de celulase da invenção nos seus cromossomos são selecionadas também pela introdução de um ou mais marcadores, homólogos ou heterólogos, os quais permitem a seleção de células hospedeiras as quais contêm o vetor de expressão no cromossomo, por exemplo, o marcador por proporcionar resistência a biocida, por exemplo, resistência a antibióticos, ou metais pesados, tais como cobre, ou marcadores complementando uma mutação auxotrófica no cromossomo hospedeiro, e semelhantes. O gene do marcador selecionável pode ou estar diretamente ligado às seqüências de gene de DNA a serem expressas ou introduzido na mesma célula por co-transformação.

Uma vez que o vetor ou seqüência de DNA da invenção contendo o(s) constructo(s) é preparada para expressão, o(s) constructo(s) de DNA é introduzido numa célula hospedeira apropriada por qualquer uma de uma variedade de formas adequadas, incluindo a transformação conforme é co-

nhecido na técnica. Depois da introdução do vetor, as células receptoras crescem num meio seletivo, o qual seleciona para o crescimento de células transformadas.

5                   Sistemas hospedeiros de expressão e produção adequados são, por exemplo, o sistema de produção desenvolvido para o hospedeiro de fungo *Trichoderma* (EP 244 234), ou um sistema de produção de *Aspergillus*, tal como *A. oryzae* ou *A. niger* (WO 9708325 e WO 9533386, US 5.843.745, US 5.770.418), ou a produção de um sistema desenvolvido para *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier et al., 1989). Sistemas de produção adequados desenvolvidos para bactéria são um sistema de produção desenvolvido para *Bacillus*, por exemplo *B. subtilis* ou para *E. coli*, ou para o actinomicete *Streptomyces*. Sistemas de produção adequados desenvolvidos para leveduras são sistemas desenvolvidos para *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces* ou *Pichia pastoris*. Sistemas de produção em alguns outros micróbios ou em células de mamíferos ou em plantas também são possíveis.

                  A expressão da(s) seqüência(s) de gene clonado resulta na produção da proteína desejada, ou na produção de um fragmento dessa proteína. Essa expressão pode ocorrer de uma forma contínua nas células transformadas, ou de uma forma controlada.

20                   Fragmentos são entendidos como sendo partes das moléculas de ácido nucléico longas o suficiente para codificar para a proteína descrita ou um fragmento biologicamente ativo seu. O termo "derivado" significa nesse contexto que as seqüências de nucleotídeos dessas moléculas diferem das seqüências das moléculas de ácido nucléico descritas acima em uma ou mais posições e são altamente homólogas à referida seqüência. Homologia é entendido por se referir a uma identidade de seqüência de pelo menos 40%, particularmente a uma identidade de pelo menos 60%, preferivelmente mais de 80% e ainda mais preferivelmente de mais de 90%. Os desvios das moléculas de ácido nucléico descritos acima podem ser o resultado da anulação, substituição, inserção, adição ou combinação. Homologia, além disso, significa que as respectivas seqüências de nucleotídeo ou proteínas codificadas são funcionalmente e/ou estruturalmente equivalentes.

Conforme usado no presente contexto, as expressões "preparação de enzima" e "preparação de celulase" se referem a qualquer produto enzimático, o qual contém pelo menos uma proteína de fusão de celulase. Conseqüentemente, tal preparação de enzima pode ser um meio de cultura  
5 gasto ou filtrado contendo uma ou mais proteínas de fusão de celulase ou uma ou mais proteínas de fusão de celulase e outras enzimas, uma proteína de fusão de celulase isolada ou uma mistura de uma ou mais proteínas de fusão de celulase ou uma mistura de uma ou mais proteínas de fusão de celulase e uma ou mais outras enzimas. Além da atividade da proteína de  
10 fusão de celulase, tal preparação pode conter aditivos, tais como estabilizantes, tampões, conservantes, tensoativos e/ou componentes de meio de cultura. Aditivos preferidos são tais, os quais são comumente usados nas preparações enzimáticas tencionadas para o pedido, onde a preparação enzimática é usada. A preparação enzimática pode estar na forma de líquido, pó  
15 ou granulado.

Por "meio de cultura gasto" é aqui significado o meio de cultura do hospedeiro compreendendo as enzimas produzidas. Preferivelmente, as células hospedeiras são separadas do referido meio depois da produção.

A preparação enzimática pode compreender uma ou mais proteínas de fusão de celulase da presente invenção ou outras enzimas de celulase juntamente com uma ou mais proteínas de fusão de celulase da presente invenção. Por exemplo, proteínas de fusão de celulase com diferentes propriedades podem ser combinadas para tornar a preparação enzimática mais útil para diferentes condições.

25 Para obter as preparações enzimáticas da invenção, os hospedeiros com as propriedades desejadas (isto é, hospedeiros capazes de expressar quantidades economicamente praticáveis das proteínas de fusão de celulase da invenção) são cultivados sob condições adequadas, as enzimas desejadas são secretadas dos hospedeiros no meio de cultura e a preparação  
30 enzimática é recuperada do referido meio de cultura por métodos conhecidos na técnica.

A preparação enzimática pode compreender, além da proteína

de fusão de celulase, uma ou mais outras enzimas, as quais podem ser, por exemplo, amilases, lacases e/ou peroxidases. Alternativamente, antes, durante ou depois do tratamento com a proteína de fusão de celulase da presente invenção, outro tratamento enzimático pode ser executado. O tratamento enzimático pode compreender, por exemplo, um ou mais tratamentos com amilase, um ou mais tratamentos com celulase e/ou um ou mais tratamentos com peroxidase e/ou lacase. Quais outras enzimas são incluídas na preparação enzimática ou são usadas no tratamento enzimático, depende da aplicação.

10 A preparação enzimática pode ser o meio de cultura com ou sem as células hospedeiras naturais ou transformadas, ou é recuperada do mesmo pela aplicação de métodos bem conhecidos na técnica. Entretanto, devido às proteínas de fusão de celulase da invenção serem secretadas no meio de cultura e apresentarem atividade nas condições ambiente do líquido  
15 celulótico, é uma vantagem da invenção que as preparações enzimáticas da invenção possam ser utilizadas diretamente do meio de cultura sem purificação adicional. Caso desejado, tais preparações podem ser liofilizadas ou a atividade enzimática, de outra forma, concentrada e/ou estabilizada para estocagem. As preparações enzimáticas da invenção são muito econômicas  
20 para suprir e usar porque (1) as enzimas podem ser usadas de uma forma bruta; o isolamento de uma enzima específica do meio de cultura é desnecessário e (2) devido às enzimas serem secretadas no meio de cultura, somente o meio de cultura precisa ser recuperado para obter a preparação enzimática desejada; não há necessidade de extrair uma enzima dos hospedeiros. Preferivelmente, o hospedeiro para tal produção é *Trichoderma*, e  
25 especialmente *T. reesei*.

As preparações enzimáticas da invenção podem ser fornecidas como um líquido ou como um sólido, por exemplo, uma forma de pó seco ou granular ou líquida, especialmente de grânulos que não espanam, ou um  
30 líquido estabilizado, ou a preparação enzimática pode ser, de outra forma, concentrada ou estabilizada para estocagem ou uso. É previsto que preparações enzimáticas contendo uma ou mais das celulases neutras da inven-

ção podem ser adicionalmente enriquecidas ou tornadas parcialmente ou completamente deficientes em atividades enzimáticas específicas, de forma a satisfazer os requerimentos de uma utilidade específica em várias aplicações, por exemplo, na indústria têxtil. Uma mistura de atividades enzimáticas secretadas por um hospedeiro e, especialmente, um fungo, pode ser escolhida como sendo vantajosa numa aplicação industrial particular, por exemplo, desbotamento.

As preparações enzimáticas da invenção podem ser ajustadas para satisfazer os requerimentos de necessidades específicas em várias aplicações na indústria têxtil, de detergente ou de polpa e papel.

Misturas podem ser preparadas com outras macromoléculas que não são necessariamente todas produzidas a partir do mesmo hospedeiro (por exemplo, outras enzimas tais como endoglucanases, proteases, lipases, peroxidases, oxidases ou amilases) ou substâncias químicas que podem aumentar o desempenho, estabilidade ou tamponamento da preparação enzimática desejada. Grânulos que não espanam podem ser revestidos. Preparações enzimáticas líquidas podem ser estabilizadas pela adição de um poliol, tal como propilenoglicol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico ou ácido bórico, ou cloreto de sódio, de acordo com métodos estabelecidos.

Formas protegidas das enzimas da invenção podem ser preparadas conforme descrito na EP 238.216.

As preparações enzimáticas da invenção podem conter um tensoativo o qual pode ser aniônico, não-iônico, catiônico, anfotérico ou uma mistura desses tipos, especialmente quando usada como uma composição detergente. Composições detergentes úteis estão descritas, por exemplo, na WO 94/07998, Patente Americana No. 5.443.750 e na Patente Americana No. 3.664.961.

Caso requerida, uma enzima desejada pode ser ainda purificada de acordo com condições convencionais, tais como extração, precipitação, cromatografia, cromatografia por afinidade, eletroforese ou semelhantes.

As preparações enzimáticas dessa invenção são especialmente úteis na indústria têxtil, preferivelmente em desbotamento e no bioacaba-

mento ou na indústria detergente. Outras áreas úteis são na indústria de polpa e papel.

Lavagens de pedra têm três passos: desgrude, abrasão e pós-tratamento. O primeiro passo, o processo de desgrude é normalmente o primeiro tratamento úmido do jeans e significa a remoção de amido ou de outros agentes de grude aplicados usualmente aos fios urdidos para prevenir o dano durante o processo de tecelagem. Alfa-amilases são usadas para remover goma baseada em amido para um processamento úmido melhorado e uniforme. Depois da desgomagem os jeans são normalmente rinsados com água ou continuados diretamente com o passo de abrasão.

O segundo passo, abrasão, pode ser efetuado com enzimas ou pedra-pomes ou ambas. Em todos os casos, a ação mecânica é necessária para remover o corante, e o tratamento é geralmente executado em máquinas de lavar roupa, como lavadoras de tambor. O termo "abradado" significa aqui a aparência do tecido de sarja de Nimes quando ele foi tratado por enzimas de celulase ou pedras, ou ambos. Como resultado da remoção de corante desigual, existem contrastes entre áreas com corante e áreas a partir das quais corante foi removido. Expressões sinônimas são "aparência de lavado em pedra" ou "aparência gasta". Na lavagem com pedra enzimática, ou desbotamento, a abrasão com pedra-pomes é completamente ou parcialmente eliminada e a celulase é adicionada para facilitar a abrasão do corante índigo da superfície da fibra. O tratamento com celulase pode ser feito usando celulases neutras ou ácidas, ou ambas. Se um tecido não for tratado com celulase ou lavado em pedra, a aparência do tecido é dita como sendo "pesada", uma vez que os contrastes da moda poderiam estar faltando. Quando um efeito mais desbotado é desejado, o alvejamento usando agentes químicos e/ou métodos enzimáticos, tais como tratamento com lacase, pode ser executado.

Abrasão é geralmente seguida pelo terceiro passo, depois do tratamento, que inclui os passos de lavagem e de rinsagem durante os quais detergentes, clarificadores óticos ou amaciantes podem ser usados. Depois do tratamento enzimático, a reação deve ser interrompida para prevenir da-

nos dos materiais tratados, por exemplo, por inativação por temperatura e/ou pH, o último compreendendo uma rinsagem completa e/ou uma remoção por lavagem do detergente. Isso assegura que a força mecânica da fibra não é adicionalmente comprometida pela presença continuada da enzima.

5 Por "sarja de Nimes" se entende, juntamente com essa invenção, tecido de sarja de Nimes, usualmente peças de roupa de sarja de Nimes, particularmente jeans. Vantajosamente, a sarja de Nimes é sarja de Nimes corada com índigo. Sarja de Nimes também pode ser tratada com  
10 indigo, com derivados do índigo ou sarja de Nimes corada com índigo juntamente com algum outro corante, por exemplo, sarja de Nimes corada com índigo fundo de enxofre.

Tratamento com celulase(s) pode substituir completamente o tratamento com pedras-pomes (por exemplo, 1 Kg de enzima comercial vs. 100 Kg de pedras). Entretanto, o tratamento com celulase pode ser combinado com o tratamento com pedra-pomes quando for desejado produzir um  
15 acabamento pesadamente abradado. Um efeito de pele de pêssego no qual uma fina cobertura semelhante a pêlos espichada é criada também é conseguido por uma lavagem combinando uma celulase neutra com pedra-pomes. As celulasas dessa invenção são especialmente úteis para proporcionar um  
20 visual abradado e para minimizar o manchamento de fundo no desbotamento.

Desbotamento é preferivelmente efetuado num pH de cerca de 4,5 - 9,5, e mais preferivelmente entre um pH de 6,0 - 8,0. A temperatura da reação pode variar de cerca de 40 - 80°C, preferivelmente entre 50 - 70°C, e  
25 mais preferivelmente entre 55 - 65°C, e mais preferivelmente a 60°C. A proporção de líquido (a proporção do volume de líquido por peso de tecido) pode variar de cerca de 2:1 - 30:1, preferivelmente 4:1 - 15:1, e mais preferivelmente de 5:1 - 10:1. A dosagem enzimática pode variar de cerca de 5 - 8000 NCU/g de tecido, preferivelmente de 20 - 3000 NCU/g de tecido e mais  
30 preferivelmente de 30 - 1500 NCU/g de tecido. O tempo de tratamento pode variar entre 15 min - 4 h, mais preferivelmente de 20 min - 90 min e mais preferivelmente de 30 min - 60 min. Deve ser enfatizado que a dosagem en-

zimática depende em grande parte do tipo de tecido, maquinaria, condições do processo (pH, temperatura, proporção do líquido, tempo de tratamento, carga de sarja de Nimes, escala do processo) e do tipo de preparação enzimática e semelhantes. Caso desejado, pedra-pomes podem ser usadas juntamente com as proteínas celulase de fusão. A dosagem enzimática requerida será, então, significativamente mais baixa. Uma pessoa versada na técnica é capaz de definir dosagens e condições adequadas.

As proteínas de fusão de celulase da invenção são úteis na indústria têxtil para o bioacabamento de tecidos ou peças de roupa, por exemplo, remoção de pilling, desfloculação, clarificação de cor, redução da aspereza, criação de diferentes acabamentos (por exemplo, um efeito de "pele de pêssego", "gasto", "lavado em areia" ou "aparência antiga") e o bioacabamento dos fios (por exemplo, redução dos pêlos, melhoria da maciez). As proteínas de fusão de celulase dessa invenção podem ser usadas no bioacabamento em ácido e em condições neutras usando basicamente as mesmas condições que no desbotamento.

As proteínas de fusão de celulase dessa invenção são úteis nas composições detergentes para melhorar as propriedades de cuidado de tecido por antipilling, anti-acinzentamento, clarificação de cor e amaciamento, e para melhorar o efeito de limpeza têxtil, por exemplo, remoção de manchas.

O material têxtil que é tratado com as preparações enzimáticas da invenção pode ser produzido de celulose natural contendo fibras ou celulose sintética contendo fibras ou misturas suas. Exemplos de celulósicos naturais são algodão, linho, cânhamo, juta e rami. Exemplos de celulósicos sintéticos são viscose, acetato de celulose, triacetato de celulose, "rayon", cupro e liocel. Os celulósicos acima mencionados podem também ser empregados como misturas de fibras sintéticas tais como poliéster, poliamida ou fibras acrílicas. O material têxtil pode ser fio ou tricotado ou trançado ou formado por qualquer outra forma.

As celulasas da invenção, além de serem especialmente úteis para o tratamento de tecidos, são úteis em geral em qualquer área que re-

queira a atividade de celulase.

Na indústria de polpa e de papel, celulases neutras podem ser usadas, por exemplo, na retirada de tinta de diferentes papéis reciclados e em papelões com pH neutro ou alcalino, na melhoria da qualidade da fibra ou no aumento da drenagem na produção de papel. Outros exemplos incluem a remoção do espessante da pasta de estampagem e do excesso de corante depois da estampagem têxtil, e como um tratamento para ração animal. Por exemplo, se a aplicação tencionada for a melhoria da força da polpa mecânica, então as preparações enzimáticas da invenção podem fornecer uma ou mais dessas proteínas de forma a aumentar ou facilitar a capacidade das fibras de celulose de se ligarem juntas. De uma forma similar, na aplicação do refinamento da polpa, as preparações de proteína de fusão de celulase da invenção podem proporcionar uma ou mais dessas proteínas num nível que intensifique ou facilite tal expansão. Das proteínas de fusão da invenção especialmente adequadas para aplicações de polpa são aquelas com 50 KB de *Melanocarpus albomyces* ou núcleo de CBHI de *Thermascus aurantiacus*.

As proteínas de fusão de celulase da presente invenção proporcionam vantagens não-esperadas quando usadas na indústria têxtil e especialmente em desbotamento. As proteínas de fusão de celulase da invenção são consideravelmente mais eficientes do que as celulases da técnica anterior. No desbotamento pelo menos dosagens duas vezes, usualmente pelo menos três vezes e mesmo seis vezes menores em termos de unidades de atividade de celulase neutra dosadas no peso do tecido puderam ser usadas, sem impedir a força do tecido. Em outras palavras, um desempenho até seis vezes maior é alcançado pelo uso das proteínas de fusão de celulase da presente invenção. Uma vez que o rendimento da produção das proteínas de fusão de celulase da invenção corresponde àquele da celulase 20K conhecida, a eficiência de produção global é significativamente melhorada. Isso pode ser proporcionado grandemente para grandes economias nas quantidades de enzimas necessárias: a possibilidade de usar quantidades reduzidas da enzima oferece um valor econômico considerável em termos

tanto de produção quanto de uso, incluindo a logística.

A invenção é descrita em maiores detalhes nos seguintes exemplos, os quais não são para serem interpretados para estreitar o escopo da invenção, mas somente para esclarecer o uso da invenção.

5                   **Exemplo 1. Construção dos vetores de expressão para as proteínas de fusão cbd + 20k**

Métodos de biologia molecular padronizados foram usados no isolamento, purificação e tratamentos enzimáticos de DNA (plasmídeos, fragmentos de DNA) em reações em cadeia da polimerase (PCR), em trans-  
10                   formações com *E. coli*, etc. Os métodos básicos usados estão descritos nos manuais de biologia molecular padrões, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989) e Sambrook and Russell (2001).

Constructos de plasmídeos foram projetados para juntar a seqüência codificadora de 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A, AC#  
15                   AJ515703; SEQ ID. NO: 1) com a seqüência codificadora do ligante e CBD do CBHI de *Trichoderma reesei* (AC# AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993; SEQ ID. NO: 3). De modo geral, seis junções diferentes foram projetadas conforme descrito na Tabela 1.

Para os constructos #1 e #2 estabelecidos na Tabela 1, um único sítio NruI foi introduzido na extremidade da seqüência codificadora 20K. Esse sítio capacita a fusão direta depois do códon para a serina #213 do 20K maduro com qualquer fragmento de DNA com uma extremidade sem corte. Uma reação de PCR correu com os iniciadores 20K\_Nco (SEQ ID NO: 11) e 20K\_NruXho (SEQ ID NO: 14) com o plasmídeo pALK1480 (Fig. 1)  
25                   como o molde usando o programa A (Tabela 3). pALK1480 tem a cópia genômica de cel45A de *M. albomyces* (codificando a Cel45A ou 20K) inserida sob o promotor *T. reesei cbh1* como uma fusão exata e com o terminador *cbh1* à jusante do gene no vetor pUC19 (New England, Biolabs, Inc., EUA). A mistura de reação de PCR continha tampão de reação 1 x DyNAzyme™  
30                   EXT (Finnzymes, Finlândia), Mg<sup>2+</sup> 8 mM ( a concentração final ajustada com MgCl<sub>2</sub> adicionado), dNTPs 0,2 mM, 0,5 µM de cada iniciador, 1,0 unidade de DNA polimerase DyNAzyme™ (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente

500 ng/100  $\mu$ L do molde. O produto de PCR foi digerido com enzimas de restrição NcoI e XhoI e o fragmento foi isolado do gel de agarose depois da eletroforese. O fragmento de 6,1 Kb semelhantemente cortado e isolado de pALK1480 foi ligado com o fragmento de PCR, e transformado em *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, EUA). O DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes, e um candidato adequado foi verificado por seqüenciamento. O plasmídeo resultante foi designado como pALK1429.

As reações de PCR foram efetuadas separadamente como acima compares de iniciadores 1\_BamMly (SEQ ID NO: 16) + XhoAge (SEQ ID NO: 15) e 2\_BamMly (SEQ ID NO: 17) +XhoAge (SEQ ID NO: 15) com pALK492 como o molde (Fig. 2) e os produtos de PCR resultantes, contendo o ligante e CBD, foram digeridos com MlyI (produzindo uma extremidade sem corte exatamente antes do primeiro códon desejado da seqüência codificadora do ligante e CBD) e AgeI. pALK492 carrega cerca de 6,9 Kb do fragmento PstI de DNA cromossomal QM6a de *T. reesei* abrigando o gene *cbh1/cel7A* subclonado no sítio PstI de pUC19. pALK1429 obtido acima foi digerido com NruI e AgeI, e a parte do vetor foi isolada e ligada separadamente com os dois produtos de PCR digeridos obtidos acima, e transformada em XL1-Blue de *E. coli*. DNAs de plasmídeos foram isolados, verificados por seqüenciamento e os plasmídeos resultantes foram designados como pALK1430 (carregando o produto de PCR 1\_BamMly + XhoAge como uma inserção) e como pALK1431 (carregando o produto de PCR 2\_BamMly + XhoAge como uma inserção).

**Tabela 1. Diferentes junções construídas entre 20K de *Melanocarpus albomyces* e o ligante CBHI + CBD de *Trichoderma reesei*.**

# construto	Junções núcleo-ligante	Molde do núcleo 20K pALK1480		Molde CBD + ligante pALK492		Construções de plasmídeos
		Iniciador 5'	Iniciador 3'	Iniciador 5'	Iniciador 3'	
1	...hddggfavfkaps.-gsgn...	20K_NcoI	20K-NruXho_GPI	1_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1434 <- pALK1430 <- pALK1429
2	...hddggfavfkaps.-ggnppg...	20K_NcoI	20K-NruXho_GPI	2_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1435 <- pALK1431 <- pALK1429
3	...hddggfa.fGPIgs-tgn...	20K_NcoI_2	20K-NruXho_GPI	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1768 <- pALK1764 <- pALK1758
4	...hddggfWGEIgs-tgn...	20K_NcoI_3	20K-NruXho_WGEI	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1769 <- pALK1765 <- pALK1759
5	...hddggfPavQIPSS-tgn...	20K_NcoI_2	20K-NruXho_PavQIPS	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1770 <- pALK1766 <- pALK1760
6	...hddggfaWGEIgs-tgn...	20K_NcoI_3	20K-NruXho_WGEI-2	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1775 <- pALK1774 <- pALK1773

Na segunda coluna, a parte mais à esquerda é a seqüência derivada de *Melanocarpus* e a parte mais à direita é a seqüência derivada de *Trichoderma*. Letras minúsculas indicam seqüências originais, letras maiúsculas indicam a seqüência modificada, período (.) indica um aminoácido anulado e um hífen indica o ponto de junção unido pela ligação dos plasmídeos relevantes. O primeiro aminoácido da seqüência de *Melanocarpus* é a histidina #201 da seqüência madura e nos constructos #1, #3, #4 e #6 o primeiro aminoácido da seqüência *Trichoderma* é glicina #427, no constructo #2 é glicina #434 e no constructo #5 serina #428 da seqüência madura.

**Tabela 2. Iniciadores usados**

Iniciador	Comprimentos	Seqüência	ID Seqüência NO:
20K_Nco	27	5'- TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGC	11
20K_Nco_2	35	5'-TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGCACGGGGGG	12
20K_Nco_3	46	5'-TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGCACGGGGGGCGACCTCGGCA	13
20K_NruXho	40	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGGGGGCCCTTGAAGACGGCGAA	14
XhoAge	30	5'-TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTTCGC	15
1_BamMly	34	5'-TAGGATCCGAGTCCCATTGGCAGCACCGGCAACC	16
2_BamMly	36	5'-TAGGATCCGAGTCCCTAGCGGGCGCAACCCCTCCCGGC	17
3_BamMly	34	5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCCTAGCG	18
20K-NruXho_GPI	55	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCGATGGGGCCGAAGCGCCGTCGTCGTG	19
20K-NruXho_WGEI	52	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCGATCTGCCCCAGAACCCGTCGTCGTG	20
20K-NruXho_PavQIPS	58	5'CGTACTCGAGTCATCGCGAGCGAGGGGATCTGGACGGGGGAAGCCCGTCGTCGTG	21
20K-NruXho_WGEI-2	52	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCGATCTGCCCCAGCGGAAGCCCGTCGTC	22
50KB_NruI XhoI	37	5'-TCGTCTCGAGTCGGATGGGGCCGAAGCGGATGTTGG	23
50KB_Sphi	31	5'-GGAGGGCATGCCCAACAGCAGCGAGATCACC	24
2_50K_NruI SpeI	38	5'-CGGCACTAGTTCGGACCCGATCTGCCCCAGCGCAGG	25
50K_XhoI	26	5' CGCCGAGGGCCGGCTCGAGAGCATCC	26

**Tabela 3. Programas de reação de PCR usados**

	Programa			
Passo	A	B	C	D
1	95°C 5 min	95°C 5 min	98°C 1 min	98°C 1 min
2	95°C 1 min	95°C 1 min	98°C 30 s	98°C 30 s
3	55°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	65°C 30 s
4	72°C 1 min	72°C 1 min	GOTO 2 29x	72°C 1 min
5	GOTO 2 24x	GOTO 2 24x	72°C 10 min	GOTO 2 29x
6	4 °C ESPERA	72°C 1 min	4°C ESPERA	72°C 10 min
7		4°C ESPERA		4°C ESPERA

O marcador amdS e a região flanqueadora cbh1 3' de *T. reesei* foram inseridas nos vetores pALK1430 e pALK1431 como se segue: pALK424 (Patente Americana No. 5.837.51; figura 3) foi cortado com EcoRI e SpeI, o fragmento resultante de 4,8 Kb foi deixado sem corte pela reação de preenchimento de Klenow, e ligado separadamente com plasmídeos pALK1430 e pALK1431 cortados com StuI, respectivamente, e transformado em XL1-Blue de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeos foram isolados e a orientação desejada das inserções foi averiguada por digestão com enzimas de restrição apropriadas. Os plasmídeos verificados foram designados como pALK1434 (inserção do pALK1430) e pALK1435 (inserção do pALK1431), respectivamente (Tabela 1).

Para os constructos #3, #4, #5 e #6 estabelecidos na Tabela 1 foi feita uma tentativa diferente. A seqüência codificadora do 20K e de pontos de junção modificados diferentes (Tabela 1) foram designadas para terminar no códon que codifica serina, o qual forma uma parte do sítio Nrul adicionado. Para todos aqueles constructos a mesma inserção foi usada para fornecer a seqüência codificante da maior parte do ligante e de CBD. O último foi construído como se segue: Uma reação de PCR foi efetuada com a mistura reacional descrita acima (exceto sem Mg<sup>2+</sup> adicionado) e usando o par de iniciadores 3\_BamMly (SEQ ID NO: 18) e XhoAge (SEQ ID NO: 15) e DNA de pALK492 como o molde. O programa B na Tabela 3 foi usado. O produto de PCR resultante foi digerido com BamHI e XhoI, isolado e ligado com a parte do vetor similarmente cortado de pBluescript II KS+ (Stratagene, EUA), e transformado em XL1 Blue de *E. coli*. o DNA de plasmídeo foi isola-

do, verificado por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificado por seqüenciamento. Um plasmídeo candidato com a seqüência desejada foi escolhido e designado como pALK1767.

5 Para o constructo #3 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K\_Nco\_2 (SEQ ID NO: 12) e 20K-NruXho\_GPI (SEQ ID NO: 19) e DNA de pALK1480 como o molde. Duas misturas reacionais foram usadas: uma com a composição descrita acima para a construção de pALK1767 e a outra com DMSO adicionado para 3% (v/v). Essas duas misturas reacionais foram divididas e corridas com os programas C e D na Tabela 3. Todas as reações produziram fragmentos de DNA de tamanho esperado, e as preparações foram combinadas e digeridas com NcoI e XhoI. Os fragmentos de DNA foram isolados e ligados com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformados em XL1 Blue de *E. coli*. O DNA de plasmídeo foi isolado, verificado por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificado por seqüenciamento. Um plasmídeo candidato com a seqüência desejada foi escolhido e designado como pALK1758.

20 Para o constructo #4 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K\_Nco\_3 (SEQ ID NO: 13) e 20K-NruXho\_WGEI (SEQ ID NO: 20) e DNA de pALK1480 como o molde. A mistura reacional de PCR continha tampão de reação 1x Phusion™ GC (Finnzymes, Finlândia), dNTPs 0,2 mM, 0,5 μM de cada iniciador, DMSO 3% (v/v) e 1,0 unidade de DNA polimerase Phusion™ (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 70 ng/100 μL do molde. A mistura reacional foi dividida e corrida com os programas C e D na Tabela 3. Ambas as reações produziram fragmentos de DNA de tamanho esperado, e as preparações foram combinadas e digeridas com NcoI e XhoI. O fragmento de DNA foi isolado e ligado com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformado em XL1 Blue de *E. coli*. O DNA de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificados por seqüenciamento. Um plasmídeo candidato com a seqüência desejada foi escolhido e designado como pALK1759.

Para o constructo #5 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K\_Nco\_2 (SEQ ID NO: 12) e 20K-NruXho\_PavQIPS (SEQ ID NO: 21) e DNA de pALK1480 como o molde. Duas misturas reacionais foram usadas: uma com a composição descrita acima para a construção de pALK1759 e a outra sem DMSO. Essas duas misturas reacionais foram divididas e corridas com os programas C e D na Tabela 3. Todas as reações produziram fragmentos de DNA de tamanho esperado, e as preparações foram combinadas e digeridas com NcoI e XhoI. O fragmento de DNA foi isolado e ligado com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformados em XL1 Blue de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificados por seqüenciamento. Um plasmídeo candidato foi escolhido e designado como pALK1760; ele adquiriu uma mutação no sítio XhoI único, mas isso não apresentou problema para a subclonagem adicional.

Para o constructo #6 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K (SEQ ID NO: 13) e 20K-NruXho\_WGEI2 (SEQ ID NO: 22) e DNA de pALK1480 como o molde (70 ng/100  $\mu$ L). A mesma composição da mistura reacional foi usada para a construção do plasmídeo pALK1767, e ela correu com o programa C na Tabela 3. A preparação foi digerida com NcoI e XhoI. O fragmento de DNA foi isolado e ligado com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformados em XL1 Blue de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificados por seqüenciamento. Um plasmídeo candidato foi escolhido e designado como pALK1773.

Os plasmídeos pALK1758, pALK1759, pALK1760 e pALK1773 foram separadamente cortados com NruI e AgeI, e as partes do vetor foram isoladas. Cada preparação foi ligada com um fragmento de 235 pb isolado do pALK1767 depois da digestão com MlyI e AgeI, e cada mistura de ligação foi transformada separadamente em XL10-Gold de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição

apropriadas e verificados por seqüenciamento. Os plasmídeos verificados foram designados como pALK1764, pALK1765, pALK1766, e pALK1774, respectivamente (Tabela 1).

5 O marcador amdS e a região flanqueadora 3' cbh1 de *T. reesei* foram inseridas em vetores pALK1764, pALK1765, pALK1766, e pALK1774 como se segue: pALK424 foi cortado com EcoR1 e Spe1, o fragmento de 4,8 Kb resultante foi tornado sem corte pela reação de preenchimento de Klenow e ligado separadamente com os plasmídeos pALK1764, pALK1765, pALK1766 e pALK1774 cortados com StuI, respectivamente, e transforma-  
10 dos em XL10-Gold de *E. coli*. DNAs de plasmídeo foram isolados e a orientação desejada das inserções foi checada por digestão das enzimas de restrição apropriadas. Os plasmídeos verificados foram designados como pALK1768, pALK1769, pALK1770, e pALK1775, respectivamente (Tabela 1) (Fig. 10).

#### 15 **Exemplo 2. Produção das proteínas de fusão cbd + 20k em *T. reesei***

Cassetes de expressão linear de 8,7 Kb dos plasmídeos pALK1434 e pALK1435 foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão com EcoRI e transformados para protoplastos A47 de *T. reesei*. As  
20 transformações foram efetuadas conforme descrito em Penttilä *et al.* (1987) com as modificações descritas em Karhunen *et al.* (1993) selecionando com acetamida como a única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram purificados nas placas de seleção através de conídias individuais antes de serem esporuladas em PD (Ágar batata dextrose).

25 A produção de cbd + 20k dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias num meio indutor de celulase complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5% em pH 5,5. A atividade enzimática da proteína de fusão foi medida como a liberação dos açú-  
30 cures redutores da carboximetilcelulose (CMC 3%) a 50 °C em tampão Hepes 50 mM pH 7,0 em 10 min (atividade NCU, nkat; Bailey e Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). Atividades de NCU dos melhores transforman-

tes produtores estão apresentadas na Tabela 4. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots, nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A proteína cbd + 20k foi detectada dos sobrenadantes de cultura usando os anticorpos policlonais promovidos contra a celulase neutra de 20K de *Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004) e o sistema AP de Western blot ProtoBlot (Promega). A análise de Western blot mostrou que as enzimas cbd + 20k de fusão foram produzidas principalmente como proteínas de fusão estáveis em *T. reesei*.

10 **Tabela 4. Atividades NCU dos transformantes cbd + 20k selecionados de culturas de frasco de agitação**

Transformante	Construção	Número RF	Atividade da celulase neutra, NCU/mL	Fenótipo de celulase endógena
A47/pALK1434/#20	#1	RF5580	3278	CBHI-
A47/pALK1434/#23	#1	RF5581	2091	(CBHI+)
A47/pALK1434/#37	#1	RF5582	2330	CBHI-
A47/pALK1435/#3	#2	RF5583	3624	CBHI-
A47/pALK1435/#7	#2	RF5584	3211	CBHI-
A47/pALK1435/#11	#2	RF5585	1172	(CBHI+)
A47/pALK1435/#14	#2	RF5586	3152	CBHI-

Na Tabela 4, o número de construção se refere à Tabela 1; o número RF se refere àqueles onde os transformantes foram nomeados como cepas RF.

15 O alvejamento possível do cassete de expressão para o local *cbh1* (*cel7A*) foi varrido como um fenótipo CBHI negativo por Western blot. A detecção da proteína CBHI foi efetuada usando os anticorpos monoclonais CI-258 ou CI-261 (Aho *et al.*, 1991) e o sistema de Western blot ProtoBlot AP (Promega, EUA). Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots, nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como sonda.

20 Cassetes de expressão lineares de 8,7 Kb dos plasmídeos pALK1768, pALK1769, pALK1770 e pALK1775 preparados no Exemplo 1 foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão de EcoRI e trans-

25

formados em protoplastos RF5796 e RF5798 de *T. reesei* (ambas as cepas originadas da cepa QM6a (Bailey e Nevalainen, 1981) e com o fenótipo C-BHI- CBHII- EGI- EGII- para as celulases *T. reesei* endógenas) selecionando com acetamida como a única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram  
5 purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de serem esporuladas em PD.

A produção de cbd + 20k dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias num meio indutor de celulase complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% em pH 5,5. A atividade NCU das proteínas de fusão cbd + 20k produzidas foi, a seguir, ensaiada conforme descrito acima. As atividades NCU dos transformantes selecionados estão apresentadas na Tabela 5. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots nos quais várias  
10 digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A proteína cbd + 20k foi detectada a partir dos sobrenadantes de cultura usando os anticorpos policlonais levantados contra a celulase neutra 20K de *M. albomyces* (Haakana *et al.* 2004) e o sistema AP de Western blot ProtoBlot (Promega, EUA). A análise de Western blot  
15 mostrou que a enzima cbd + 20k de fusão foi produzida pelos transformantes. Algumas culturas mostraram também uma banda reagindo com o antissoro anti-20K e com a mobilidade da proteína 20K do tipo selvagem, indicando que possivelmente alguma clivagem do ligante + CBD ocorreu durante o cultivo. A proteína de fusão cbd + 20k produzida pelos transformantes  
20 pALK1770 foi escolhida em estudos adicionais devido à sua estabilidade.

25

**Tabela 5. Atividades NCU dos transformantes cbd + 20k dos cultivos do frasco de agitação**

Transformante	No. de construção	Número RF	Atividade da celulase neutra, NCU/mL
RF5796/pALK1768/#6	#3	RF5966	3622
RF5796/pALK1768/#7	#3	RF5967	1316
RF5796/pALK1768/#9	#3	RF6035	6605
RF5798/pALK1768/#11	#3	RF5970	1525
RF5798/pALK1768/#17	#3	RF5971	2885
RF5798/pALK1768/#20	#3	RF5972	2598
RF5796/pALK1769/#7	#4	RF5968	4344
RF5796/pALK1769/#10	#4	RF5969	4858
RF5796/pALK1769/#11	#4	RF6036	6145
RF5798/pALK1769/#4	#4	RF5973	4505
RF5798/pALK1769/#8	#4	RF5974	4895
RF5796/pALK1770/#13	#5	RF5975	3073
RF5796/pALK1770/#17	#5	RF5976	2256
RF5796/pALK1770/#22	#5	RF5977	2107
RF5798/pALK1770/#10	#5	RF5978	1907
RF5798/pALK1770/#14	#5	RF5979	3661
RF5796/pALK1775/#8	#6	RF6078	2431
RF5796/pALK1775/#13	#6	RF6079	3505
RF5796/pALK1775/#21	#6	RF6080	2541
RF5798/pALK1775/#22	#6	RF6081	1697
RF5798/pALK1775/#29	#6	RF6082	3096

Na Tabela 5, o número de construção se refere à Tabela 1; o número RF se refere àqueles onde os transformantes foram nomeados como cepas RF.

Cepas RF5582, RF5583, RF6036, RF5977 e RF5978 de *T. reesei* cresceram num bioreator para testes de aplicações. Algumas preparações foram tratadas por aquecimento (pH 6,0, 65°C, 60 - 70 min) para inativar qualquer atividade de enzima endógena de *T. reesei* remanescente. cbd + 20k é relativamente estável ao aquecimento (Miettinen-Oinonen *et al.* 2004), e não desnatura durante o tratamento.

### **Exemplo 3. Produção das proteínas mutantes de afinidade cbd + 20k de fusão em *T. reesei***

Enzima 20K de *Melanocarpus albomyces* (*cel45A*, AC# AJ515703)

foi fundida com o domínio de ligação à celulose (CBD) de CBHI de *Trichoderma reesei* no qual os resíduos de tirosina conservados nas posições 31 (correspondendo ao Y492 do polipeptídeo maduro) e/ou 32 (correspondendo ao Y493 do polipeptídeo maduro) foram modificados para alanina conforme descrito por Linder *et al.*, 1995. Além disso, o resíduo de tirosina na posição 31 foi substituído por triptofano, um aminoácido naturalmente encontrado na região CBD de, por exemplo, *Humicola grisea* CBHI (Azevedo *et al.*, 1990) e *T. reesei* EGV (Cel45A, Saloheimo *et al.*, 1994). Os CBDs modificados foram

5  
10  
15  
20

construídos por PCR e as substituições dos aminoácidos de Y31A, Y32A, Y31W e Y31A\_Y32A foram incluídas no domínio de ligação de celulose do CBHI de *T. reesei* (numeração de acordo com a seqüência de aminoácidos do CBD). Em todos os constructos, o iniciador "forward" 3\_BamMly: 5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCG-3' (SEQ ID. NO: 18) foi usado. Os iniciadores reversos usados para a amplificação de diferentes produtos CBD<sub>mut</sub> estão descritos na Tabela 6. As misturas de reação de PCR continham tampão reacional 1 x PfuUltra™ HF (Stratagene, EUA) fornecendo concentração de Mg<sup>2+</sup> 2 mM, dNTPs 0,2 mM, 2 μM de cada iniciador e 1,5 unidades de DNA polimerase PfuUltra™ HF (Stratagene, EUA) e aproximadamente 45 ng de plasmídeo pALK492 como molde. O plasmídeo pALK492 (Fig. 2) contém o gene *cbh1* de *T. reesei*. As condições para as reações de PCR foram as seguintes: 2 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min de anelamento a 65 °C (gradiente de ± 5 °C), 2 min de extensão a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 10 min.

Tabela 6. Iniciadores de PCR reverso projetados para amplificar produtos de CBD modificados

Iniciador	Comprimento (nts)	Seqüência, reversa	Substituição de aminoácido	ID de seqüência NO:
XhoAge_Y31A	69	5'-TGACTCGAGACCGGTCCGTTCAGGCTTTCGGACCGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGTAGGCAGGGTTCAGG	Y31A	SEQ ID. NO: 27
XhoAge_Y32A	69	5'-TGACTCGAGACCGGTCCGTTCAGGCTTTCGGACCGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGGGCTAAGGGTTCAGG	Y32A	SEQ ID. NO: 28
XhoAge_Y31W	69	5'-TGACTCGAGACCGGTCCGTTCAGGCTTTCGGACCGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGTACCAAGGGTTCAGG	Y31W	SEQ ID. NO: 29
XhoAge_Y31A-Y32A	69	5'-TGACTCGAGACCGGTCCGTTCAGGCTTTCGGACCGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGGGCGCAGGGTTCAGG	Y31A_Y32A	SEQ ID. NO: 30

Todas as combinações de PCR produziram o fragmento de DNA específico nas reações de PCR na temperatura de anelamento de 60 °C. Os produtos de PCR foram isolados dessas reações, digeridos com enzimas de restrição XhoI e BamHI e, a seguir, clonados para o pBluescript II KS+ (Stratagene, EUA). Os plasmídeos obtidos foram nomeados como pALK1884 (mutação Y31A), pALK1885 (mutação Y32A), pALK1886 (mutação Y31W) e pALK1887 (mutações Y31A\_Y32A). Os fragmentos de PCR nos plasmídeos foram confirmados por seqüenciamento. As inserções digeridas MlyI e AgeI dos plasmídeos pALK1884 a pALK1887 foram ainda ligadas a um fragmento de vetor pALK1760 digerido com NruI e AgeI contendo o gene 20K de *Melanocarpus albomyces* de comprimento total fundido com o terminador e promotor cbh1 (cel7A) de *T. reesei*. A parte C terminal do gene 20K no pALK1760 foi modificada de forma que a ligação do fragmento CBD produziu um ponto de junção de PAVQIPSS (constructo #5) o qual mostrou resultar num produto de fusão estável em *T. reesei* conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. No passo final, o marcador amdS foi adicionado como um fragmento SpeI-EcoRI de extremidade sem corte (4,5 Kb) do plasmídeo p3SR2 (Fig. 6) para obter plasmídeos de expressão de pALK1877 (mutação Y31a), pALK1878 (mutação Y32A), pALK1879 (mutação Y31W) e pALK1880 (mutação Y31A\_Y32A) para a produção de enzimas cbd + 20k<sub>mut</sub> de fusão em *T. reesei*. As seqüências de aminoácidos da proteína 20K de fusão ao peptídeo ligante, seguidas pela região CBD modificada estão apresentadas na figura 11B. Os plasmídeos de expressão foram conformados por seqüenciamento, e os cassetes de expressão lineares de 8,4 Kb (Fig. 11A) foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão com NotI e foram transformados em protoplastos RF5796 de *T. reesei*. As transformações foram efetuadas em Pentillä *et al.* (1987) com as modificações descritas em Karhunen *et al.* (1993), selecionando com acetamida como a única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de serem esporuladas em PD.

A produção de cbd + 20k<sub>mut</sub> dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50

mL). Os transformantes cresceram por 7 dias num meio indutor de celulase complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% em pH 5,5. A atividade enzimática da proteína de fusão foi medida como a liberação dos açúcares redutores da carboximetilcelulose (CMC 3%) a 50 °C em tampão Hepes 50 mM pH 7,0 em 10 min (atividade NCU, nkat; Bailey e Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). Atividades de NCU dos melhores transformantes produtores estão apresentadas na Tabela 7. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots, nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A proteína  $\text{cbd} + 20\text{k}_{\text{mut}}$  foi detectada dos sobrenadantes de cultura usando os anticorpos policlonais promovidos contra a celulase neutra de 20K de *Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004) e o sistema AP de Western blot ProtoBlot (Promega). A análise de Western blot mostrou que as enzimas  $\text{cbd} + 20\text{k}_{\text{mut}}$  de fusão foram produzidas principalmente como proteínas de fusão estáveis em *T. reesei*.

**Tabela 7. Atividades NUC dos transformantes  $\text{cbd} + 20\text{k}_{\text{mut}}$  selecionados a partir de cultivo de frasco de agitação**

Transformante	Substituição de aminoácido	Número RF	Atividade de celulase neutra, NCU/mL
pALK1877/#26	Y31A	RF6084	3658
pALK1877/#34	Y31A	RF6085	2447
pALK1878/#02	Y32A	RF6086	3434
pALK1878/#13	Y32A	RF6088	2915
pALK1879/#13	Y31W	RF6090	2545
pALK1879/#24	Y31W	RF6091	3452
pALK1880/#06	Y31A_Y32A	RF6092	3415
pALK1880/#25	Y31A_Y32A	RF6094	2727

Número RF se refere àqueles que os transformantes foram nomeados como cepas RF.

As cepas de RF6084 a RF6086, RF6088, RF6090 a RF6092 e RF6094 foram, fermentadas para obter material para os testes de aplicação (ver Exemplos 9 - 11).

**Exemplo 4. Produção das proteínas de anulação de ligante  $\text{cbd} + 20\text{k}$  de fusão em *T. reesei***

Enzima 20K de *Melanocarpus albomyces* foi fundida com o do-

mínio de ligação à celulose (=CBD) do CBHI de *Trichoderma reesei*, o qual foi ainda modificado pela introdução de anulações no peptídeo ligante interdomínio. As anulações do ligante foram projetadas de acordo com Srisodsuk *et al.*, 1993. A anulação de aminoácidos da posição 434 até a 444 (mutante  $\Delta$ G-444) do polipeptídeo maduro remove aproximadamente um terço do ligante incluindo a seqüência repetida rica em glicina e em prolina, mas deixando todos os sítios de O-glicosilação putativos intactos. A anulação dos resíduos da posição 434 até a posição 460 (Mutante  $\Delta$ G-460) remove praticamente todo o ligante (Fig. 12A). Anulações de ligante cbd + 20k adicionais com uma mutação de dupla afinidade de Y31A\_Y32A na região CBD foram também construídas.

Reações de PCR foram efetuadas para introduzir as anulações ao peptídeo ligante assim como a substituição do aminoácido à região CBD. As amplificações de PCR foram feitas conforme descrito no Exemplo 3, exceto que a temperatura de anelamento de 60 °C (gradiente de  $\pm$  5°C) foi usada. Os iniciadores "forward" 5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCA CCACCACCACCCGCCGCCAGCC-3' (SEQ ID. NO: 31) e 5'-TAGGATC CGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCCCTACCCAGTCTCACTACGGCC AGTGC-3' (SEQ ID. NO: 32) foram usados para sintetizar as anulações do ligante de  $\Delta$ G-444 e do  $\Delta$ G-460, respectivamente. Correspondentemente, o iniciador reverso 5'-TGA CT CGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTCGCACGGA GCTTTACAGG-3 (SEQ ID. NO: 33) foi usado para amplificar a região CBD intacta do CBHI de *T. reesei*. A mutação Y31A\_Y32A da região CBD foi gerada com o iniciador reverso 5'-TGA CT CGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTCGCACG GAGCTTTACAGGCACTGAGAGGCGGCAGGGTTCAGG-3' (SEQ ID. NO: 30).

Todas as combinações de iniciadores produziram o fragmento de DNA específico nas reações de PCR na faixa de 55,2°C até 65,0°C de temperaturas de anelamento. Os plasmídeos de expressão pALK1893 (anulação  $\Delta$ G-444 ), pALK1896 (anulação  $\Delta$ G-460), pALK1899 (anulação  $\Delta$ G-444, mutação Y31A\_Y32A) e pALK1952 (anulação  $\Delta$ G-460, mutação Y31A\_Y32A) foram construídos conforme descrito no Exemplo 3. As se-

qüências de aminoácidos da proteína de fusão 20K para o peptídeo ligante cortado seguido pelo CBD intacto ou modificado estão apresentadas na figura 12B. Os cassetes de expressão linear de 8,3 Kb foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão por EcoRI e foram transformados em protoplastos RF5796 de *T. reesei*. Transformação, purificação transformante, culturas de frasco de agitação, medições de atividade, hibridizações por Southern blot, e análises de Western blot foram efetuadas conforme descrito no Exemplo 3.

**Tabela 8. Atividades NCU dos transformantes de anulação de ligante CBD + 20K selecionados a partir do cultivo de frascos de agitação**

Transformante	Anulação do ligante / substituição do aminoácido	Número RF	Atividade da celulase neutra, NCU/mL
pALK1893/#08	$\Delta$ G-444	RF6107	1182
pALK1893/#10	$\Delta$ G-444	RF6108	2058
pALK1896/#05	$\Delta$ G-460	RF6110	2576
pALK1896/#07	$\Delta$ G-460	RF6111	2628
pALK1899/#07	$\Delta$ G-444, Y31A_Y32A	RF6112	1947
pALK1899/#20	$\Delta$ G-444, Y31A_Y32A	RF6114	2462
pALK1952/#01	$\Delta$ G-460, Y31A_Y32A	RF6115	2428
pALK1952/#17	$\Delta$ G-460, Y31A_Y32A	RF6116	1738

O número RF se refere àqueles onde os transformantes foram nomeados como cepas RF.

As cepas selecionadas RF6107, RF6108, RF6110 até RF6112 e RF6114 até RF6116 foram fermentadas para obter material para os testes de aplicação (Exemplos 9 a 11). A análise de Western blot mostrou que as enzimas de anulação de ligante CBD + 20K de fusão foram produzidas como proteínas de fusão estáveis em *T. reesei*.

**Exemplo 5. Produção da proteína de fusão 50K + CBD de *Melanocarpus albomyces* recombinante em *T. reesei*.**

Constructos de plasmídeos foram projetados para juntar a sequência codificadora de 50K de *Melanocarpus albomyces* (cel7A, AC# AJ515704) com a região ligante e o domínio de ligação de celulose (CBD) do CBHI de *T. reesei* (cel7A, AC# AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993). Plasmídeo

pALK1237 (Fig. 4), o qual é uma base para os novos constructos, contém o gene *cel7A* sob controle do promotor *cbh1* de *T. reesei* como uma fusão exata.

Primeiro, um único sitio de restrição *NruI* foi introduzido próximo do C-terminal da seqüência codificadora 50K. Isso capacita a fusão direta de qualquer DNA sem corte depois do aminoácido S393 do polipeptídeo 50K maduro (Fig. 13B). Uma reação de PCR foi efetuada com os iniciadores 2\_50K\_ *NruI**SpeI* (5' CGGCACTAGTTCGCGACCCGATCTCGCCCCAGCGCAGG 3'; SEQ ID. NO: 25) e 50K\_ *XhoI* (5' CGCCGAGGGCCGGCTCGAGAGCATCC 3'; SEQ ID. NO: 26) usando pALK1237 como um molde. A reação de PCR continha 1 x de tampão de reação DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlândia), dNTPs 0,25 mM, 0,5 µM de cada iniciador, 2,0 unidades de DNA polimerase de DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 50 ng/100 µL de DNA molde pALK1237. As condições para a amplificação por PCR foram como se segue: 5 min de desnaturação inicial a 96 °C, seguido por 25 ciclos de 15 s a 96 °C, anelamento de 60 s a 56 °C ou 61 °C, 60 s de extensão a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 10 min. O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *SpeI* e purificado a partir de gel de agarose. O fragmento de PCR purificado foi ligado no fragmento de restrição *XhoI*-*SpeI* de 6,9 Kb do plasmídeo pALK1237 e transformado em XL1-Blue de *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes e três candidatos foram verificados por seqüenciamento. O clone selecionado foi designado como pALK1703.

O ligante CBHI + CBD de *T. reesei* foi amplificado por PCR com iniciadores 3\_ *Bam**Mly*\_50 (5'TTGGATCCGAGTCGCAGCACCCGGCAACCC TAGCG 3'; SEQ ID. NO: 36) e *Xho**Age* (5' TGA~~CT~~CGAGACCGGTGCGT-CAGGCTTTCGC 3'; SEQ ID. NO: 15) usando pALK492 como molde. As condições de reação de PCR foram conforme descritas acima, exceto que o tempo de extensão na reação de amplificação foi de 90 s. O produto de PCR foi digerido com enzimas *MlyI* e *AgeI* e purificado a partir de gel de agarose. O fragmento de PCR contendo o ligante + CBD foi ligado no fragmento de restrição *AgeI*-*NruI* de 6,8 Kb de pALK1703 e transformado em XL1-Blue *E.*

*coli* (Stratagene, EUA). Os transformantes foram analisados conforme descrito acima e um clone adequado foi designado como pALK1704.

Para capacitar a seleção de transformantes de *T. reesei* o gene marcador *amdS* e a região flanqueadora 3' *cbhl* de *T. reesei* foi inserida no plasmídeo do vetor pALK1704. Um fragmento de restrição EcoRI-SpeI de 4,8 Kb de pALK424 (US 5.837.515) foi isolado e as extremidades do fragmento foram preenchidas com enzima Klenow. O fragmento marcador *amdS* de extremidade sem corte foi ligado no pALK1704 digerido Stul e transformado em XL1-Blue *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes e a orientação desejada da inserção foi verificada pela digestão da enzima de restrição. O transformante selecionado foi designado como pALK1708.

Um cassete de expressão linear de 9,2 Kb (Fig. 13A) da estrutura pALK1708 foi isolado por digestão por EcoRI, transformado em protoplastos RF5636 de *T. reesei* (derivados da cepa QM6a; Bailey e Nevalainen, 1981), e transformantes selecionados com acetamida como a única fonte de nitrogênio. A cepa do hospedeiro não tem três celulasas endógenas principais: CBHII (Cel6A), EGI (Cel7B) e EGII (Cel5A). A transformação foi efetuada de acordo com Penttillä *et al.* (1987) com modificações descritas por Karhunen *et al.* (1993). Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de esporular as mesmas em PD.

A produção da proteína de fusão 50K + CBD dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura de criações de frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias num meio indutor de celulose complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% em pH 5,5. A atividade enzimática da proteína de fusão foi medida como a liberação dos açúcares redutores da carboximetilcelulose (CMC 3%) a 50°C em tampão Hepes 50 mM pH 7,0 em 10 min (atividade NCU; Bailey e Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). A atividade dos transformantes variou de 2035 a 3633 NCU/mL. A proteína 50K + CBD foi detectada a partir do sobrenadante da cultura por sistema AP de Western blot ProtoBlot (Promega) usando anticorpos policlonais promovidos contra a celulase neutra 50K de

*Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004). A análise de Western blot mostrou que a proteína de fusão 50K + CBD produzida de *T. reesei* é estável. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por Southern blotting usando o cassete de expressão como uma sonda.

- 5 O alvejamento possível do cassete de expressão para o local *cbh1* também foi verificado por Western blotting usando anticorpos CBHI monoclonais (CI-261, Aho *et al.*, 1991) para detectar a proteína CBHI.

**Exemplo 6. Produção da proteína de fusão 50KB+CBD de *Melanocarpus albomyces* recombinante em *T. reesei*.**

- 10 Constructos de plasmídeo foram projetados para se juntar à seqüência codificadora 50K de *Melanocarpus albomyces* (*cel7B*, AC# AJ515705) que codifica a seqüência com a região ligante e o domínio de ligação de celulose (CBD) do CBHI de *T. reesei* (*cel7A*, AC# AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993). Plasmídeo pALK1241 (Fig. 5), o qual é uma base para os novos constructos,  
15 contém o gene *cel7B* sob controle do promotor *cbh1* de *T. reesei* como uma fusão exata.

- Primeiro, um único sítio de restrição *NruI* foi introduzido próximo do C-terminal da seqüência codificadora 50KB. Isso capacita a fusão direta de qualquer DNA sem corte depois do aminoácido S426 do polipeptídeo  
20 50KB maduro (Fig. 14B). Uma reação de PCR foi efetuada com os iniciadores 50KB\_*NruI*XhoI (5' TCGTCTCGAGTCGCGATGGGGCCGAAGCGGATGTTGG 3'; SEQ ID. NO: 23) e 50KB\_*SphI* (5' GGAGGGCATGCCCAA-CAGCAGCGAGATCACC 3'; SEQ ID. NO: 24) usando pALK1241 como molde. A reação de PCR continha tampão de reação 1 x DyNAzyme™ (Finnzymes, Finlândia), dNTPs 0,25 mM, 0,5 µM de cada iniciador, 2,0 unidades de  
25 DNA polimerase de DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 50 ng/100 µL de DNA molde pALK1241. As condições para a amplificação por PCR foram como se segue: 5 min de desnaturação inicial a 96 °C, seguido por 25 ciclos de 15 s a 96 °C, anelamento de 60 s a 56 °C ou 61  
30 °C, 60 s de extensão a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 5 min. O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *SphI* e purificado a partir de gel de agarose. O fragmento de PCR purificado foi ligado no

fragmento de restrição XhoI-SpeI de 6,9 Kb do plasmídeo pALK1241 e transformado em XL1-Blue de *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes e um candidato foi verificado por seqüenciamento. O clone selecionado foi designado como pALK1705.

5 O ligante CBHI + CBD de *T. reesei* foi amplificado por PCR com os iniciadores 3\_BamMly\_50 (5' TTGGATCCGAGTCGCAGCACCGGCAA CCCTAGCG 3'; SEQ ID. NO: 18) e XhoAge (5' TGACTCGAGACCGGTGC GTCAGGCTTTTCGC 3'; 15) usando pALK492 como molde. As condições da reação de PCR foram conforme é descrito acima, exceto que o tempo de  
10 extensão na reação de amplificação foi de 90 s. O produto de PCR foi digerido com enzimas MlyI e AgeI e purificado a partir de gel de agarose. O ligante + CBD contendo fragmento de PCR foi ligado no fragmento de restrição AgeI-NruI de 7,2 Kb de pALK1705 e transformado em XL 1-Blue *E. coli* (Stratagene, EUA). Os transformantes foram analisados conforme descrito  
15 acima e um clone adequado foi designado como pALK1706.

Para capacitar a seleção de transformantes de *T. reesei* o gene marcador *andS* e a região flanqueadora 3' *cbhI* de *T. reesei* foram inseridos no plasmídeo do vetor pALK1706. Um fragmento de restrição de EcoRI-SpeI de 4,8 Kb de pALK424 (US 5.837.515) foi isolado e as extremidades do  
20 fragmento foram preenchidas com enzima Klenow. O fragmento do marcador *andS* de extremidade sem corte foi ligado no pALK1706 digerido com *StuI* e transformando em XLI-Blue *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes e a orientação desejada da inserção foi verificada pela digestão da enzima de restrição. O transformante selecionado  
25 foi designado como pALK1709.

Um cassete de expressão linear de 9,6 Kb (Fig. 14A) da estrutura pALK1709 foi isolado por digestão de EcoRI, transformado em protoplastos RF5636 de *T. reesei*, e os transformantes selecionados com acetamida como a única fonte de nitrogênio. A cepa do hospedeiro não tem três células endógenas principais: CBHII (Cel6A), EGI (Cel7B) e EGII (Cel5A). A transformação foi efetuada de acordo com Penttillä et al. (1987) com modificações descritas por Karhunen et al. (1993). Os transformantes foram purifi-  
30

cados em placas de seleção através de conídias simples ante de esporular as mesmas em PD.

A produção da proteína de fusão 50KB + CBD dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas de frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias num meio indutor de celulose complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% em pH 5,5. A atividade enzimática da celobioidrolase da proteína de fusão foi medida usando substrato de 4-metilumbelferil- $\beta$ -D-lactosídeo (atividade MUL; van Tilbeurgh *et al.* 1988). A proteína 50KB + CBD foi detectada a partir dos sobrenadantes da cultura por sistema AP de Western blot Pro-  
toBlot (Promega) usando anticorpos policlonais levantados contra a celulase 50KB de *Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004). Na análise de Western blot nenhuma proteína de 50KB do tipo selvagem foi detectada mostrando que a proteína de fusão 50KB + CBD produzida a partir de  
15 *T. reesei* é estável. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por Southern blotting usando o cassete de expressão como uma sonda. O alvejamento possível do cassete de expressão para o local *cbhl* também foi verificado por Western blotting usando anticorpos CBHI monoclonais (CI-261, Aho *et al.*, 1991) para detectar a proteína CBHI.

20 **Exemplo 7. Produção das proteínas de fusão CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante em *T. reesei***

CBHI de *Thermoascus aurantiacus* (AC# AF478686, Hong *et al.*, 2003; SEQ ID. NO: 9) foi fundido com o ligante e CBD de CBHI de *Trichoderma reesei* (AC# AR088330, Srisodsuk *et al.* 1993; SEQ ID. NO: 3). Primeiro, a seqüên-  
25 cia codificadora do ligante e o CBD de CBHI de *T. reesei* foi sintetizada por PCR usando os seguintes iniciadores: 5'-TTAAACATATGTTATCTACTCC AACATCAAGGTCGGACCCATTGGCAGCACCGGCAACCCTAGCGGC-3' (seqüência "forward", SEQ ID. NO: 34) e 5'-TATATGCGGCCGCACCGG TGCGTCAGGCTTTTCGCACGGAGCTTTACAGGC-3' (seqüência reversa,  
30 SEQ ID. NO: 35).

A mistura de reação de PCR continha 1 x de tampão de reação DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlândia),  $\text{Mg}^{2+}$  15 mM., dNTPs 0,2 mM, 2

$\mu\text{M}$  de cada iniciador, 0,6 unidades de DNA polimerase de DyNAzyme™ EXT (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 75 ng/30  $\mu\text{L}$  de molde pALK492. O plasmídeo pALK492 contém o gene *cbh1* (*cel7A*) de *T. reesei*. As condições para a reação de PCR foram as seguintes: 2 min de desnatura-  
5 ração inicial a 98 °C, seguido por 30 ciclos de 30 seg a 98 °C, 30 seg de anelamento a 68 °C (gradiente de  $\pm 4$  °C), 30 seg de extensão a 72 °C e uma extensão final a 72 °C por 10 min. O fragmento de DNA específico na reação de PCR foi obtido na faixa de temperatura de anelamento de 64 °C até 68,5 °C. O fragmento CBD sintetizado, contendo também a seqüência de  
10 nucleotídeos 3'-terminal do gene *cbh1* de *Thermoascus aurantiacus* foi digerido pelas enzimas de restrição NdeI e NotI e o fragmento foi isolado a partir de gel de agarose depois da eletroforese. Depois disso, o fragmento de PCR isolado foi ligado ao fragmento de vetor pALK digerido por NdeI e NotI (Fig. 7) contendo o gene *cbh1* de *Thermoascus aurantiacus* de comprimento  
15 completo. O plasmídeo obtido foi nomeado como pALK1888, e o fragmento de PCR amplificado no plasmídeo foi confirmado por seqüenciamento. Como resultado da fusão, a parte C-terminal do CBHI de *Thermoascus aurantiacus* no plasmídeo pALK1888 contém um ponto de junção de GPIGST (Fig. 15B). A inserção digerida SacII e AgeI do plasmídeo pALK1888 foi ligada ao frag-  
20 mento do vetor pALK1694 digerido SacII e AgeI (Fig. 8), o que resulta na fusão CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* ao terminador e promotor (uma fusão exata) *cbh1* de *T. reesei* (*cel7A*). No passo final, o fragmento marcador amdS foi adicionado, conforme descrito no Exemplo 3, para obter o plasmídeo de expressão de pALK1890 para a produção da enzima de fu-  
25 são CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante em *T. reesei*. A seqüência de aminoácidos da fusão da proteína CBHI de *Thermoascus aurantiacus* com o peptídeo ligante seguido pela região CBD de CBHI de *T. reesei* é apresentada na figura 15B.

O plasmídeo de expressão foi confirmado pelas digestões da  
30 enzima de restrição, e o cassete de expressão linear de 8,9 Kb (Fig. 15A) foi isolado da estrutura do vetor depois da digestão NotI e foi transformado nos protoplastos RF5796 de *T. reesei*. As transformações foram efetuadas como

em Pentillä *et al.* (1987) com as modificações descritas em Karhunen *et al.* (1993). Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de esporular as mesmas em PD.

A produção de CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* dos transformantes foi analisada através dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias num meio de indução de celulase complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% em pH 5,5. A atividade da celobioidrolase foi avaliada usando substrato de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-lactosídeo (MUL) de acordo com van Tilbeurgh *et al.* 1988. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o cassete de expressão foi usado como uma sonda. A análise de SDS-PAGE mostrou que a enzima CBHI + CBD *Thermoascus aurantiacus* recombinante foi produzida como uma proteína de fusão estável em *T. reesei*.

#### **Exemplo 8. Desempenho das preparações de proteína CBD + 20K de fusão em acabamento/desbotamento de sarja de Nimes**

Proteínas de fusão CBD + 20K produzidas usando *Trichoderma* como hospedeiro conforme descrito no Exemplo 2 foram testadas quanto à sua capacidade em desbotamento da sarja de Nimes para criar uma aparência abradada semelhante àquela fornecida por pedra-pomes. Uma preparação de 20K comercial eficiente no acabamento de sarja de Nimes foi usada para comparação.

Jeans inglês feito de sarja de Nimes corada com índigo com fundo de enxofre foi usado como material de teste depois de desgomar com alfa-amilase ECOSTONE® A200. Fios urdidos e tramados no tecido foram "ring spun". Os tratamentos de celulase foram efetuados com extrator de lavagem Wascator FOM 71 CLS da Electrolux sob condições descritas na Tabela 9.

**Tabela 9. Condições e teste usadas nos tratamentos de celulase**

Parâmetro de processo	
Carga de sarja de Nimes	1.3 Kg
Água	19 l
Tampão / controle de pH (pH 6.5)	31.6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 10.5 g ácido cítrico
Tempo	55 min
Temperatura	60°C
Dosagem de celulase	250 - 3000 NCU/g de tecido

As enzimas foram dosadas como unidades de atividade de celulase neutra (NCU) por peso de tecido. A enzima celulase foi inativada depois da drenagem pela elevação do pH acima de 11 pela adição de 5 g de NaOH (10 min, 40 °C) e pela rinsagem três vezes. Os jeans foram secos num tambor secador de roupa. Dois pares de jeans foram usados em cada teste.

O nível de efeito de desbotamento/abrasão foi avaliado pela medição da cor como valores de reflectância com espectrofotômetro Minolta CM 2500 ou CM 1000 usando coordenadas de espaço de cor L\*a\*b\* (iluminador D65/2º). A cor do lado da face e o lado reverso da sarja de Nimes (dados não mostrados) foi medida depois da desgomagem (isto é, antes do tratamento com celulase) e depois do tratamento com celulase. Cada medição foi a média de aproximadamente 40 medidas. Dois pares de jeans foram usados em cada teste e o resultado final é a média deles. A claridade ou o aumento da claridade depois do tratamento com a enzima foi usado para a avaliação do efeito de abrasão (desempenho ou efeito desbotamento). Os resultados estão mostrados nas Tabelas 10 e 11, onde o negrito é usado para ressaltar os níveis de abrasão semelhantes e as dosagens equivalentes. Os tratamentos com 20K ou sem qualquer enzima foram usados para comparação. Algumas das preparações (Tabela 11) foram tratadas com aquecimento (pH 6,0, 65 °C, 60 a 70 min) para inativar qualquer atividade enzimática endógena de *T. reesei* remanescente e/ou para testar o efeito do tratamento com aquecimento na estabilidade da enzima.

Tabela 10. Medições de cor do lado da face da sarja de Nimes tratada com proteínas de fusão CBD + 20K

Cepa No.	Enzima	NCU/ g de tecido	Tratamento antes da celulase		Tratamento depois da celulase		Aumento de L*
			L*	b*	L*	b*	
-	Sem enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K <sup>1</sup>	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K <sup>1</sup>	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF6036	CBD + 20K	500	16,41	-10,14	22,80	-14,19	6,40
RF5977	20K +CBD	250	16,68	-9,91	22,81	-14,47	6,13
RF5977	20K +CBD	500	16,73	-10,01	24,07	-14,70	7,34
RF5977	20K +CBD	1500	16,71	-9,68	25,63	-14,79	8,93

L\* indica a clareza, -b\* indica a direção do azul, +b\* indica a direção do amarelo.

<sup>1</sup>Preparação comercial

Tabela 11. Medições de cor do lado da face da sarja de Nimes tratada com proteínas de fusão CBD + 20K tratadas com aquecimento.

Cepa No.	Enzima	NCU/g de tecido	Tratamento antes da celulase		Tratamento depois da celulase		Aumento de L*
			L*	b*	L*	B*	
-	Sem enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K <sup>1</sup> (não tratado com aquecimento)	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K <sup>1</sup> (não tratado com aquecimento)	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF5206	20K CBHI-	3000	16,80	-10,00	22,61	-14,59	5,81
RF5582	20K+ constructo CBD #1, CBHI-	3000	16,83	-10,01	26,39	-15,13	9,56
RF5582	20K+ constructo CBD #1, CBHI-	1000	16,61	-9,76	23,98	-14,98	7,37
RF5582	20K+ constructo CBD #1, CBHI-	500	16,70	-9,93	22,75	-14,75	6,05
RF5583	20K+ constructo CBD #2, CBHI-	3000	16,73	-9,98	24,78	-14,95	8,05
RF5583	20K+ constructo CBD #2, CBHI-	1000	16,92	-9,92	22,73	-14,57	5,81
RF5583	20K+ constructo CBD #2, CBHI-	500	16,62	-10,03	21,76	-14,37	5,14
RF5977	20K +constructo CBD #5, <sup>2</sup>	500	16,56	-9,77	23,00	-14,55	6,45

L\* indica a clareza, -b\* indica a direção do azul, +b\* indica a direção do amarelo.

<sup>1</sup>Preparação comercial, <sup>2</sup>CBHI-, CBHII-, EGI-, EGII-

Resultados na Tabela 10 e figura 16 mostram que o desempenho da lavagem das proteínas de fusão CBD + 20K da invenção no tratamento de sarja de Nimes foi muito melhorado em comparação com as cepas 20K. Com a cepa RF5977 a dosagem enzimática tão baixa quanto 250 NCU/g de tecido pôde ser usada para obter um nível de abrasão similar (clareza L\*) àquele obtido com a dosagem de 20K de 1500 NCU/g. Assim, um desempenho de lavagem 6 vezes melhor foi obtido, e contraste foi bom. Também o desempenho de lavagem obtido com a cepa RF5978 foi semelhante àquele obtido com a cepa RF5977.

Tratamento com aquecimento das preparações da proteína de fusão aparentou até certo grau diminuir o efeito de lavagem em pedra, por exemplo, com a cepa RF5977 uma dosagem de 500 NCU/g de tecido foi necessária para obter o mesmo nível de abrasão que com a dosagem de 250 NCU/g da preparação enzimática não tratada por aquecimento (Tabela 10). Todavia, uma melhora de 3 vezes no desempenho de lavagem foi alcançada em comparação com uma preparação da técnica anterior.

**Exemplo 9. Desempenho das preparações de proteína mutante de afinidade CBD + 20K de fusão e de proteína de anulação do ligante CBD + 20K de fusão no acabamento/desbotamento de sarja de Nimes**

Enzimas mutantes de afinidade CBD + 20K de fusão produzidas usando *Trichoderma* como hospedeiro conforme descrito no Exemplo 4 foram testadas quanto à sua capacidade no desbotamento da sarja de Nimes. Uma preparação 20K eficiente no acabamento de sarja de Nimes foi usada por comparação.

A sarja de Nimes e os sistemas de teste para desbotamento foram como no Exemplo 8. Também o efeito do tratamento com celulase foi avaliado como no Exemplo 8. Os resultados do teste de desbotamento para a proteína mutante de afinidade CBD + 20K de fusão e as preparações de proteína de anulação de 20K + ligante CBD de fusão estão mostradas na Tabela 12.

A cepa RF6090 com a substituição no aminoácido Y31W mos-

trou um excelente desempenho de lavagem (ca. 6 vezes melhor do que 20K) e um bom contraste. A eficiência da cepa RF6090 em comparação com 20K pode ser claramente vista também na figura 16. A cepa RF6084 com a substituição do aminoácido Y31A foi ca. 1,5 vezes melhor do que a de 20K. As

5 proteínas de fusão CBD + 20K<sub>mut</sub> com uma substituição de aminoácido Y32A ou Y31A\_Y32A teve um efeito de desbotamento mais baixo do que 20K. O desempenho de lavagem das proteínas de anulação 20K + ligante CBD no tratamento da sarja de Nimes foi muito melhorado em comparação com a cepa 20K e foi obtido um bom contraste, Com a cepa RF6108 ( $\Delta$ G-444) o

10 desempenho de lavagem foi pelo menos 6 vezes melhor do que com 20K e com a cepa RF6110 ( $\Delta$ G-460) ca. 3 vezes melhor.

**Tabela 12. Medições de cor do lado da face de sarja de Nimes tratada com mutante de afinidade CBD + 20K e proteínas de anulação de ligante CBD + 20K de fusão**

Cepa Nº.	Enzima (substituição de aminoácido)	Atividade/ g de tecido	Antes do tratamento com celulase		Depois do tratamento com Celulase		Aumento de L*
			L*	B*	L*	B*	
-	Sem enzima	0	16.77	-9.95	18.18	-12.39	1.42
-	20K <sup>1</sup>	3000	16.80	-9.70	24.00	-14.71	7.20
-	20K <sup>1</sup>	1500	16.73	-10.05	22.98	-14.62	6.25
RF6086	20K +CBDmut(Y32A)	1500	16.83	-9.68	22.05	-14.14	5.22
RF6086	20K +CBDmut(Y32A)	3000	16.68	-9.76	23.30	-14.40	6.62
RF6084	20K +CBDmut(Y31A)	1000	16.83	-9.42	23.15	-14.26	6.32
RF6090	20K +CBDmut(Y31W)	250	16.79	-9.32	22.99	-14.24	6.21
RF6090	20K +CBDmut(Y31W)	1000	16.77	-9.22	25.10	-14.74	8.33
RF6094	20K +CBDmut(Y31A_Y32A)	1500	16.78	-9.30	21.66	-14.02	4.89
RF6094	20K +CBDmut(Y31A_Y32A)	3000	16.71	-9.36	22.27	-14.14	5.56
-	20K <sup>1</sup>	3000	16.80	-9.70	24.00	-14.71	7.20
RF6108	CBD + 20K( $\Delta$ G-444)	250	16.65	-9.59	23.62	-13.97	6.97
RF6110	CBD + 20K( $\Delta$ G-460)	1000	16.81	-9.72	24.17	-14.39	7.37

L\* indica a claridade. -b\* é a direção do azul. +b\* é a direção do amarelo. <sup>1</sup>Preparação comercial

### **Exemplo 10. Efeito nas proteínas de fusão CBD + 20K na força da sarja de Nimes**

5 Alguns dos jeans obtidos a partir dos testes de lavagem com proteínas de fusão CBD + 20K (Exemplos 8 e 9) que tiveram um nível de abrasão similar ( $L^*$  - valor ca. 23 ou 24 depois do tratamento com celulase) foram selecionados pelas medições de força. A força de rasgo depois do tratamento com proteínas de fusão CBD + 20K e as amostras de controle foram medidas pelo método de Elmendorf de acordo com SFS-EN ISO 13937-1 padrão. Os exemplares foram cortados tanto na direção da urdidura 10 quanto na da trama. Os resultados estão mostrados na Tabela 13.

As proteínas de fusão da celulase causaram essencialmente a mesma perda de força ou menos que a 20K, isto é, com algumas preparações a força do tecido permaneceu ainda maior. A mais baixa perda de força tanto na direção da urdidura quanto da trama foi obtida com a cepa RF6108 15 com a anulação do ligante  $\Delta G-444$ . Também o mutante por afinidade RF6090 com a substituição do aminoácido Y31W causou uma menor perda de força do que a 20K. A cepa RF5977 teve um efeito antes similar na força do tecido do que 20K.

20 Alguns dos jeans lavados com preparações de proteína de fusão tratadas com aquecimento (Exemplo 8, Tabela 11) também foram selecionados para medições de força de rasgo. Foi notado que a força do tecido foi melhorada com algumas preparações tratadas com aquecimento, mas devido ao desempenho de lavagem reduzido, dosagens mais altas tiveram que ser usadas para obter o mesmo nível de abrasão.

**Tabela 13. Medições de força de rasgo de jeans tratado com proteínas de fusão CBD + 20K da invenção**

Cepa No.	Proteína da enzima	NCU/g de tecido	L*	Urdidura		Trama	
				Força de rasgo (N)	(%)	Força de rasgo (N)	(%)
-	Sem enzima	0	1.5	62.2	100.0	46.2	100.0
-	20K <sup>1</sup>	1500	22.9	46.3	74.4	31.9	69.0
RF5977	20K +CBD	250	22.9	48.1	77.3	32.1	69.5
RF6086	20K +CBDmut (Y32A)	3000	23.1	46.6	74.9	30	64.9
RF6084	20K +CBDmut (Y31A)	1000	23.1	47.2	75.9	30.6	66.2
RF6090	20K +CBDmut (Y31W)	250	23.2	48.6	78.1	34.4	74.5
RF6094	20K +CBDmut (Y31A_Y32A)	3000	22.3	48.4	77.8	32.9	71.2
-	20K <sup>1</sup>	3000	23.9	47.6	76.5	28.9	62.6
RF6108	CBD + 20K (□G-444)	250	23.8	54.3	87.3	35.2	76.2
RF6110	CBD + 20K (□G-460)	1000	24.0	48.4	77.8	29.8	64.5

<sup>1</sup> Preparação comercial

**Exemplo 11. Comparação das preparações de proteína de fusão CBD + 20K selecionadas com as preparações enzimáticas da técnica anterior**

As melhores proteínas de fusão CBD + 20K dos Exemplos 8 e 9 foram testadas com outro tipo de sarja de Nimes. Preparação 20K (Ecostone® NP8500) eficiente no acabamento da sarja de Nimes e duas preparações da técnica anterior comercialmente disponíveis, Denimax® 399S da Novozymes e Mex500 da Meiji, a qual é a preparação enzimática sólida mais concentrada comercialmente disponível, foram usadas para comparação.

O sistema de teste para desbotamento foi como no Exemplo 8, exceto que a carga de sarja de Nimes foi de 1 Kg e a proporção de líquido, conseqüentemente, foi levemente maior. Cinco peças de sarja de Nimes ("pernas") feitas de sarja de Nimes Down Under (Bradmill Textiles Pty, Austrália) foram usadas para cada teste depois da desgomagem. Fios de urdidura e da trama do tecido foram "ring spun". As enzimas foram dosadas como unidades de dosagem - NCU, de forma que níveis de abrasão similares (medidos como claridade do lado da face de sarja de Nimes depois do tratamento com celulase) foram obtidos. O efeito do tratamento de celulase foi avaliado como no Exemplo 8, exceto 20 medições de cor foram medidas por perna.

Duas pernas com nível de abrasão semelhantes (valor L\* ca. 26 depois do tratamento com celulase) de cada teste de lavagem foram selecionadas para as medições de força. A força de rasgo depois do tratamento com proteínas de fusão CBD + 20K e amostras de controle foram medidas como no Exemplo 10. Os resultados estão mostrados na Tabela 14 e nas Figuras 17A e 17B.

A força de rasgo do tecido, a qual é tipicamente mais fraca do fio do que a urdidura, foi mais alta com as proteínas de fusão das cepas RF5977, RF6090, RF6108 e RF6110 do que com 20K. Com todas as cepas de proteína de fusão foi obtida uma força consideravelmente maior tanto na direção da urdidura quanto da trama em comparação com DeniMax 399S e Mex 500. Também a cepa 20K foi menos prejudicial à força no tecido do que

outras preparações da técnica anterior.

**Tabela 14. Medições de força de rasgo de sarja de Nimes tratada com proteínas de fusão CBD + 20 K da invenção, 20K e preparações da técnica anterior**

Enzima	Forma	L*	Urdidura Força de rasgo (N)	Trama Força de rasgo (N)
Ecostone NP8500	Pó	25.9	58.0	40.3
RF5977, 20K+CBD	Grânulo	26.0	56.1	44.4
Mex 500, Meiji	Pó	26.1	48.4	31.1
DeniMax 399S, Novozymes	Grânulo	25.5	50.6	38.1
RF6090, 20K+CBD <sub>mut</sub> (Y31W)	Líquido	26.0	57.9	43.4
RF6108, 20K+CBD (□G-444)	Líquido	25.9	55.6	43.9
RF6110, 20K+CBD (□G-460)	Líquido	26.2	59.8	45.4

L\* indica a claridade do lado da face da sarja de Nimes depois do tratamento com celulase

5 **Exemplo 12. Desempenho da preparação de CBD + 20K no bioacabamento (remoção de pilling)**

O desempenho da preparação de proteína de fusão CBD + 20K concentrada no bioacabamento foi testado. Uma preparação de celulase ácida enriquecida com EGII comercial (US 5.874.293) usada em formulações de bioacabamento e tratamento sem enzima foram usados por comparação. Os tratamentos de remoção de pilling foram efetuados com o extrator de lavagem Wascator FOM 71 CLS da Electrolux sob as condições descritas na Tabela 15.

15 Peças de dois tipos de pulôveres não-usados feitos de 1200% de algodão: tecido baseado em jérsei e rib com superfície flocosa foram usadas como material de teste co material de enchimento. Amostras foram pré-lavadas por 10 min a 60°C com 1 mL/L de tensoativos/agentes umidificantes (Sandoclean PCJ da Sandos e Imacol CN da Clariant) e rinsadas 3 vezes. Depois disso, os tecidos de malha foram tratados com celulase a 20 60°C por 60 minutos na presença dos mesmos adjuvantes têxteis que os usados na pré-lavagem. Depois da drenagem a enzima foi inativada (por 10 min a 60°C) pela elevação do pH acima de 11 com hidróxido de sódio. As peças de roupa de malha foram, então, rinsadas três vezes e secas num

tambor secador de roupas.

**Tabela 15. As condições/parâmetros de processo de teste usados nos tratamentos de bioacabamento**

Parâmetro do processo	
Carga de tecido	1.0 Kg
Água	15 litros
Sandoclean PCJ e Imacol CN	1 mL/L
Controle de pH pH 5-5.3/pH 6-6.3	Ajuste com ácido acético (80 %)
Tempo	60 min
Temperatura	60°C
Dosagem de celulase	0.25 % a 0.63% do peso do tecido

O efeito do tratamento de celulase foi avaliado visualmente a  
 5 olho nu e com uma lupa. Os resultados estão mostrados na Tabela 16 e fo-  
 tos de câmera digital tomadas com uma macro-objetiva estão mostradas na  
 figura 18.

A preparação de proteína de fusão CBD + 20K teve excelente  
 propriedades de bioacabamento levando a uma redução extensiva na floco-  
 10 sidade e na prevenção da formação de pílulas que possam ser claramente  
 vistas a partir das fotos (tomadas das amostras de rib) na figura 18. As a-  
 mostras de controle, especialmente de pulôver rib, tratadas sem enzima,  
 continham uma flocosidade de superfície densa e pilling severo. Com a pre-  
 15 paração CBD + 20K uma superfície muito limpa da roupa de malha foi obti-  
 da já com a menor dosagem (0,25% do peso do tecido, o.w.f.), correspon-  
 dendo a uma atividade de celulase neutra de 125 NCU/g de tecido. Essa  
 dosagem resultou num efeito quase tão bom quanto uma dosagem de duas  
 vezes. Usando uma dosagem de 0,5% de preparação CBD + 20K do peso  
 do tecido, um efeito remoção de pilling semelhante foi obtido em compara-  
 20 ção com o uso de uma dosagem de 0,63% o.w.f. de preparação enriquecida  
 com EG II, que foi usada numa dosagem típica para esse concentrado de  
 enzima na aplicação do bioacabamento. Também o meio de cultura do CBD  
 + 20K produzido pelo hospedeiro recombinante é volumetricamente pelo  
 menos duas vezes tão efetivo no bioacabamento do que aquele de EG II  
 25 produzido por um hospedeiro recombinante.

**Tabela 16. Os resultados dos tratamentos de bioacabamento com proteína de fusão CBD + 20K em comparação com enriquecido com EGII e controle sem enzima**

Amostra	Dosagem g	Dosagem, % o.w.f <sup>a)</sup>	Efeito remoção de pilling <sup>b)</sup>
20K+CBD conc.	5	0.50	+++++
20K+CBD conc.	2.5	0.25	++++
EGII enriquecido conc.	6.3	0.63	+++++
Controle, sem enzima	-	-	-

a) do peso do tecido

b) +++++ Excelente efeito remoção de pilling, superfície visualmente muito limpa.

++++ Efeito remoção de pilling muito bom, superfície visualmente limpa.

- Flocosidade de superfície densa e/ou pilling severo.

### 5 Exemplo 13. Desempenho da preparação CBD + 20K na aplicação de detergente

A eficiência de uma preparação de proteína de fusão CBD + 20K granulada foi testada com ciclos de lavagem repetidos numa máquina doméstica usando enzima de 0 até 0,5% de peso de formulação detergente (detergente padrão ECE 98), a qual não continha quaisquer enzimas. As condições de teste estão descritas na Tabela 17. Carga, dosagem de detergente e as principais condições de teste foram de acordo com o padrão EN 60456:2003, mas com sujeiras adicionais. As amostras de tecido foram tomadas depois de 5, 10 e 15 lavagens.

### 15 Tabela 17. Projeto do teste para testar o desempenho da preparação CBD + 20K

Item	Especificação
Concentração de enzima em uso	0, 0.1, 0.25, 0.5 %
Máquina de lavar	Siemens 1632 IQ
Programa de lavagem	Programa de algodão padrão sem lógica flocosa
Detergente	ECE 98, 50 g por lavagem
pH do detergente no líquido de lavagem	11
Temperatura de lavagem	40/60°C
Dureza da água	16°fH
Carga	IEC60456:2003 carga de 4 Kg
Mancha artificial adicionada Total de 38 peças (37 x 37cm) de cada tipo	Art. No. 101*, algodão sujo com negro de carbono / óleo de oliva Art. No. 163*, algodão sujo com mingau de cereal Art. No. 112*, algodão sujo com manteiga
Tecido de teste	Anti-acinzentamento no Art. No. 224* Força de tensão no Art. No. 224*

\* da EMPA Test materialen AG, Suíça

Os resultados de teste no anti-acinzentamento, executado no artigo 224 (ISO 2267) e medido como diferenças de igualdade de cor, estão mostrados nas Tabelas 18 e 19 e nas Figuras 19 e 20. A diferença de cor foi medida pelo método de três estímulos usando um colorímetro Spectraflash 500 (illuminant D65/10 °).

A preparação de proteína de fusão CBD + 20K mostrou um efeito positivo no valor de cor de três estímulos Y e, conseqüentemente, no anti-acinzentamento. O efeito de diferentes concentrações enzimáticas foi aproximadamente o mesmo. Já uma concentração de enzima muito baixa (0,10%) foi suficiente para o anti-acinzentamento. Antes efeitos similares (dados não mostrados) foram obtidos com a proteína de fusão CBD + 20K em comparação com a celulase detergente comercial BIOTOUCH®DCC contendo 1,8 vezes mais atividade celulase neutra (NCU).

Artigo 224 também foi usado para medições de força elástica (dados não mostrados) efetuadas de acordo com ISO 13934-1:1999 depois de 15 lavagens. Nenhuma das concentrações enzimáticas teve um efeito danoso na força elástica. Todos os resultados estavam dentro do desvio um do outro (variação de  $\pm 2,5\%$ ). O mesmo foi aplicado ao alongamento para quebrar a carga.

**Tabela 18. Desempenho da proteína de fusão CBD + 20K na aplicação detergente.** Diferença de igualdade de cor entre o artigo 224 anti-acinzentamento lavado com enzima e o artigo original (não-lavado).

Temperatura de lavagem, conc. enzimática. (%)	Diferença (deltaY)		
	Depois de 5 lavagens	Depois de 10 lavagens	Depois de 15 lavagens
40°C, 0%	-7.46	-10.39	-12.30
40°C, 0.10%	-5.78	-6.60	-8.01
40°C, 0.25%	-5.52	-6.08	-8.18
40°C, 0.50%	-4.85	-5.24	-7.56
60°C, 0%	-8.65	-11.43	-13.95
60°C, 0.10%	-5.77	-6.77	-8.41
60°C, 0.250%	-4.72	-5.70	-7.46
60°C, 0.50%	-4.33	-6.29	-7.44

**Tabela 19. Desempenho da proteína de fusão CBD + 20K na aplicação detergente. Diferença de igualdade de cor entre o artigo 224 anti-acinzentamento lavado com enzima e a lavagem sem enzima.**

Temperatura de lavagem, concentração enzimática (%)	Diferença (deltaY)		
	Depois de 5 lavagens	Depois de 10 lavagens	Depois de 15 lavagens
40°C, 0%	0	0	0
40°C, 0.10%	1.68	3.79	4.29
40°C, 0.25%	1.94	4.31	4.12
40°C, 0.50%	2.61	5.15	4.74
60°C, 0%	0	0	0
60°C, 0.10%	2.88	4.66	5.54
60°C, 0.250%	3.93	5.73	6.49
60°C, 0.50%	4.32	5.14	6.51

## REFERÊNCIAS

- Aho S, V Oikkonen, T Jalava, M Paloheimo, R Bühler, M-L Niku-Paavola, EH Bamford and M Korhola. 1991. Monoclonal antibodies against core and cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases I and II and endoglucanase I. Eur. J. Biochem. 200:643-649.
- 5
- Azevedo Mde O, Felipe MS, Astolfi-Filho S, Radford A. 1990. Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. J Gen Microbiol. 136: 2569-2576.
- Bailey MJ and Nevalainen KMH. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. Enz Microbiol Technol. 3: 153-157.
- 10
- Haakana H, Miettinen-Oinonen A, Joutsjoki V, Mäntylä A, Suominen P, and Vehmaanperä J. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. Enz Microbiol Technol. 34: 159-167.
- 15
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309-316.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 293: 781-788.
- 20
- Hong J, Tamaki H, Yamamoto K and Kumagai H. 2003. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. Appl Microbiol Biotechnol 63: 42-50.
- Joutsjoki VV, Torkkeli TK, and Nevalainen KMH. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 24:223-228.
- 25
- Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen, and PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.
- 30
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680 – 685.

- Linder M, Mattinen ML, Kontteli M, Lindeberg G, Ståhlberg J, Drakenberg T, Reinikainen T, Pettersson G, Annala A. 1995. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Science* 4: 1056-1064.
- 5                   Lowry OH, NJ Roseborough, AL Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-275.
- Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C and Brygoo Y. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* 10 15:147-156.
- Miettinen-Oinonen A, Londesborough J, Joutsjoki V, Lantto R and Vehmaanperä, J. 2004. Three cellulases from *Melanoarpus albomyces* with applications in the textile industry. *Enz Microbiol Technol.* 34: 332-341.
- Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen, and J Knowles. 15 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61:155-164.
- Saloheimo A, Henrissat B, Hoffren AM, Teleman O, Penttilä M. 1994. A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol Microbiol* 13: 219-228.
- 20                   Sambrook J, EF Fritsch, and T Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.
- Sambrook J and DW Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.
- Srisodsuk M, Reinikainen T, Penttilä M, Teeri TT. 1993. Role of 25 the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 268: 20756-20761.
- Van Tilbeurgh H, Loontjies F, de Bruyne C, Clayssens M 1988. Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Meth. Enzymol.* 160: 45-59.
- 30                   Ward M, Shan W, Dauberman J, Weiss G, Larenas E, Bower B, Rey M, Clarkson K and Bott R. (1993) Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pI endoglucanase (EGIII) from *Trichoder-*

ma reesei. Proceedings of the second TRICEL symposium on *TRICHODERMA REESEI* CELLULASES AND OTHER HYDROLASES, Espoo, Finland, 1993, ed. by P. Suominen and T. Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8 (1993): 153-158.

## LISTAGEM SEQUÊNCIAS

<110> AB Enzymes Oy

<120> Celulases melhoradas

<130> 2050016

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 936

<212> DNA

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 1

tcgcccctaa ccgagaacca aagactccaa gaatgcgctc tactcccgtt ctccgcgccc 60

tcttgcccgc agcattgccc ctgggggccc tcgcccgaac cggtcagtec acgaggtaac 120

tgatcaccgc cctcattacg cgtgcccacc ggaccgcggtc cagggctcac tgctcaccgc 180

atccagatac tgggactgct gcaagccgctc gtgcccgtgg gccggaaagg gcccctgtaa 240

ccagcccgtc tactcgtgcg acgccaactt ccagcgcata cacgacttcg atgccgtctc 300

gggctgcgag gggggccccg ctttctcgtg gcgcccacc acgcccctggg ccattaatga 360

caacctctcg tacggcttcg cggcgactgc actcagcggc cagaccgagg agtcgtgggtg 420

ctgtgcctgc tacgcgtgag tgtgcttggg cccaacgtcg gtgattccgg agttcagacc 480

actgaccag cgaccgcgctc gccagtctga cttttacatc gggcccctg gccggcaaga 540

ccatggctgt ccagtcgacc agcacgggcg ggcacctcgg cagcaaccac ttgacacctc 600

acatccccgg cggcggcgctc ggcctcttcg acggctgcac tccccagttc gggggcctcc 660

cgggcgcacg gtacggcggc atctcgtcgc gccaggagtg cgactcgttc cccgagccgc 720

tcaagcccgg ctgccagtgg cgcttcgact ggttcagaa cgccgacaac ccgtccttta 780

ccttcgagcg ggtccagtgc cccgaggagc tggtcgctcg gaccggctgc agggcaccac 840

acgacggcgg cttcgcgctc ttcaaggccc ccagcgcctg atccgttttt gggcagtgctc 900

cgtgtgacgg cagctacgtg gaacgacctg gagctc 936

<210> 2  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Melanocarpus albomyces  
  
 <400> 2  
 Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
 20 25 30  
 Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
 35 40 45  
 Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
 50 55 60  
 Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
 85 90 95  
 Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
 100 105 110  
 Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
 115 120 125  
 Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
 130 135 140  
 Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
 165 170 175  
 Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
 180 185 190  
 Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Val  
 195 200 205  
 Phe Lys Ala Pro Ser Ala

210

<210> 3  
 <211> 1820  
 <212> DNA  
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 3  
 ccgcggaactg cgcacatcatgt atcgggaagtt ggccgctcatc tcggccttct tggccacagc 60  
 tcgtgctcag tcggcctgca ctctccaatc ggagactcac ccgcctctga catggcagaa 120  
 atgctcgtct ggtggcactt gcactcaaca gacaggctcc gtggtcacg acgccaactg 180  
 gcgctggact cacgctacga acagcagcac gaactgctac gatggcaaca cttggagctc 240  
 gaccctatgt cctgacaacg agacctgccc gaagaactgc tgtctggacg gtgccgccta 300  
 cgcgtccacg tacggagtta ccacgagcgg taacagcctc tccattggct ttgtcaccca 360  
 gtctgcccag aagaacgctg gcgctcgcct ttacctatg ggcagcagca cgacctacca 420  
 ggaattcacc ctgcttgcca acgagttctc tttcgatgtt gatgtttcgc agctgccgta 480  
 agtgacttac catgaacccc tgactatct tcttgtgggc tcccagctga ctggccaatt 540  
 taagtgccg cttgaacgga gctctctact tcgtgtccat ggacgcggat ggtggcgtga 600  
 gcaagtatcc caccaacacc gctggcgcca agtacggcac ggggtactgt gacagccagt 660  
 gtccccgca tctgaagttc atcaatggcc aggccaacgt tgagggtgg gagccgcat 720  
 ccaacaacgc aaacacgggc attggaggac acggaagctg ctgctctgag atggatatct 780  
 gggaggccaa ctccatctcc gaggtcttta cccccacc ttgcacgact gtcggccagg 840  
 agatctgca ggggtgatggg tgcggcgga cttactccga taacagatat ggcggcactt 900  
 gcgatcccga tggctgcgac tgaacccat accgcctggg caacaccagc ttctacggcc 960  
 ctggctcaag ctttaccctc gataccacca agaaattgac cgttgtcacc cagtccgaga 1020  
 cgtcgggtgc catcaaccga tactatgtcc agaatggcgt cactttccag cagcccaacg 1080  
 ccgagcttgg tagttactct ggcaacgagc tcaacgatga ttactgcaca gctgaggagg 1140  
 cagaattcgg cggatcctct ttctcagaca agggcggcct gactcagttc aagaaggcta 1200  
 cctctggcgg catggttctg gtcagtgatc tgtgggatga tgtgagttg atggacaaa 1260  
 atgcgcgctg acaaagagtc aagcagctga ctgagatgtt acagtactac gccaacatgc 1320  
 tgtggctgga ctccacctac ccgacaaaac agacctcctc cacaccgggt gccgtgcgcg 1380  
 gaagctgctc caccagctcc ggtgtccctg ctgaggtcga atctcagtt cccaacgcca 1440  
 aggtcacctt ctccaacatc aagttcggac ccattggcag caccggcaac cctagcggcg 1500  
 gcaaccctcc cggcggaaac ccgctggca ccaccaccac ccgcccacca gccactacca 1560

ctggaagctc tccccgacct acccagtctc actacggcca gtgcggcggg attggctaca 1620  
 gcggccccac ggtctgcgcc agcggcaciaa cttgccaggt cctgaaccct tactactctc 1680  
 agtgcttgta aagctccgtg cgaagcctg acgcaccggg agattcttgg tgagcccgta 1740  
 tcatgacggc ggcgggagct acatggcccc ggggtattta tttttttgt atctacttct 1800  
 gacccttttc aaatatacgg 1820

<210> 4

<211> 497

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 4

Gln Ser Ala Cys Thr Leu Gln Ser Glu Thr His Pro Pro Leu Thr Trp  
 1 5 10 15

Gln Lys Cys Ser Ser Gly Gly Thr Cys Thr Gln Gln Thr Gly Ser Val  
 20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Ala Thr Asn Ser Ser Thr  
 35 40 45

Asn Cys Tyr Asp Gly Asn Thr Trp Ser Ser Thr Leu Cys Pro Asp Asn  
 50 55 60

Glu Thr Cys Ala Lys Asn Cys Cys Leu Asp Gly Ala Ala Tyr Ala Ser  
 65 70 75 80

Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ser Leu Ser Ile Gly Phe Val  
 85 90 95

Thr Gln Ser Ala Gln Lys Asn Val Gly Ala Arg Leu Tyr Leu Met Gly  
 100 105 110

Ser Asp Thr Thr Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Leu Gly Asn Glu Phe Ser  
 115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Gln Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu  
 130 135 140

Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Val Ser Lys Tyr Pro Thr  
 145 150 155 160

Asn Thr Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys  
 165 170 175

Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp  
 180 185 190

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile Gly Gly His Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Glu Ala  
 210 215 220

Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu Ile Cys Glu Gly  
 225 230 235 240

Asp Gly Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Arg Tyr Gly Gly Thr Cys  
 245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu Gly Asn Thr Ser  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr Thr Lys Lys Leu  
 275 280 285

Thr Val Val Thr Gln Ser Glu Thr Ser Gly Ala Ile Asn Arg Tyr Tyr  
 290 295 300

Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala Glu Leu Gly Ser  
 305 310 315 320

Tyr Ser Gly Asn Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Cys Thr Ala Glu Glu Ala  
 325 330 335

Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly Leu Thr Gln Phe  
 340 345 350

Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp  
 355 360 365

Asp Tyr Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn  
 370 375 380

Glu Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Gly Ser Cys Ser Thr Ser  
 385 390 395 400

Ser Gly Val Pro Ala Gln Val Glu Ser Gln Ser Pro Asn Ala Lys Val  
 405 410 415

Thr Phe Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn Pro  
 420 425 430

Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr Thr  
 435 440 445

Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser  
 450 455 460

His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys  
 465 470 475 480

Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys  
 485 490 495

Leu

<210> 5  
 <211> 1895  
 <212> DNA  
 <213> *Melanocarpus albomyces*

<400> 5  
 gaattcgggg gttgccaggg agtcgtacag ggggtgggtgg agggggatgg gggatggaag 60  
 ggggatggag aagaaagcat atatgggacg tttgtgctcg cgggctcccc tctgccacgt 120  
 tccttgctt ccttgccctg gttgtgtgtg gtcttccctt caccatccga caaaccaacc 180  
 tgctgcgggg gaactcgcag agcgccttcg gacgacgaca gacagacgca ccatgactcg 240  
 caacatcgcc ctgctcggcg cgcgctgggc gctcctgggc ctgcccacg gccagaagcc 300  
 gggcgagacg cccgaggtgc acccgcagct gacgacgttc cggtgacca aggcggacgg 360  
 gtgccagccg cggaccaact acattgtgct ggactcgtg tgcaccccg tgcaccaggt 420  
 ggacaacgac tacaactgcg gcgactgggg gcagaagccc aacgcgacgg cgtgcccgga 480  
 cgtcagatcg tgcgcgcgca actgcatcat ggagggcgtg cccgactaca gccagcacgg 540  
 cgtaacgacg agcgacacgt cgctgcgctt gcagcagctc gtcgacggcc gctcgtcac 600  
 gccgcgcgct tacctgctcg acgagaccga gcaccgctac gagatgatgc acctgaccgg 660  
 ccaggagtgc acctttgagg tcgacgccac caagctgccc tgcggcatga acagcgcctt 720  
 ctacctgtcc gagatggacc cgaccggcgc ccggagcgag ctcaaccccg gcggtgccta 780  
 ctacggcacc ggctactgcg acgcccagtg cttcgtgacg ccattcatca acggcattgt 840  
 gagtgttccc ctttggcccc ccccctgaaa atagatgtac ctgggtgcta accccggggt 900  
 gtcgcaccaa aacagggcaa catcgagggc aagggctcgt gctgcaacga gatggacatc 960  
 tgggaggcca actcgcgggc gacgcacgtg gcgcccaca cgtgcaacca gacgggtctg 1020  
 tacatgtgcg agggcgccga gtgcgagtac gacggcgtgt gcgacaagga cgggtgctgg 1080  
 tggaaacctg accgggtcaa catcaccgac tactacggca actcggacgc gttccgcgct 1140

gacacgcggc ggccttcac cgtggtgacg cagttccgg cgcacgccga gggccggctc 1200  
 gagagcatcc accggctgta cgtgcaggac ggcaaggatga tcgagtcgta cgtcgtcgac 1260  
 gcgcccggcc tgccccggac cgactcgctc aacgacgagt tctgcgccgc cacggggcgc 1320  
 gcgcgctacc tcgacctcg cggcaccgcg ggcatgggcg acgccatgac gcgcggcacg 1380  
 gtgctggcca tgagcatctg gtgggacgag tccggcttca tgaactggct cgacagcggc 1440  
 gaggccggcc cctgcctgcc cgacgagggc gacccaaga acattgtcaa ggtcgagccc 1500  
 agccccgagg tcacctacag caacctgccc tggggcgaga tcgggtcgac ctttgaggcc 1560  
 gagtccgacg acgacggcga cggcgacgac tgctagataa ctaactagtg ggcggaaagg 1620  
 gcgggggatg cgtaacttac atacagcccg gagttgtttt gagttagag tattgagctt 1680  
 tcgatgtgtt agttgagtgg aatggaaaat tcgcgtcttt gcccgggtgg ttgcgataaa 1740  
 caatagtcgg ctggtgcatt tgtgacactt caattgcgct gttggcttgg tgacagacac 1800  
 ggcagcgtcg atgaccggac acccagaata attcgcatgg ttgattattg ttattgtgct 1860  
 ttaaactcga ggctgatgct catctcttcg aattc 1895

<210> 6

<211> 408

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 6

Gln Lys Pro Gly Glu Thr Pro Glu Val His Pro Gln Leu Thr Thr Phe

1 5 10 15  
 Arg Cys Thr Lys Ala Asp Gly Cys Gln Pro Arg Thr Asn Tyr Ile Val  
 20 25 30

Leu Asp Ser Leu Ser His Pro Val His Gln Val Asp Asn Asp Tyr Asn  
 35 40 45

Cys Gly Asp Trp Gly Gln Lys Pro Asn Ala Thr Ala Cys Pro Asp Val  
 50 55 60

Glu Ser Cys Ala Arg Asn Cys Ile Met Glu Gly Val Pro Asp Tyr Ser  
 65 70 75 80

Gln His Gly Val Thr Thr Ser Asp Thr Ser Leu Arg Leu Gln Gln Leu  
 85 90 95

Val Asp Gly Arg Leu Val Thr Pro Arg Val Tyr Leu Leu Asp Glu Thr  
 100 105 110

Glu His Arg Tyr Glu Met Met His Leu Thr Gly Gln Glu Phe Thr Phe  
 115 120 125

Glu Val Asp Ala Thr Lys Leu Pro Cys Gly Met Asn Ser Ala Leu Tyr  
 130 135 140

Leu Ser Glu Met Asp Pro Thr Gly Ala Arg Ser Glu Leu Asn Pro Gly  
 145 150 155 160

Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Phe Val Thr  
 165 170 175

Pro Phe Ile Asn Gly Ile Gly Asn Ile Glu Gly Lys Gly Ser Cys Cys  
 180 185 190

Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Arg Ala Thr His Val Ala  
 195 200 205

Pro His Thr Cys Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Met Cys Glu Gly Ala Glu  
 210 215 220

Cys Glu Tyr Asp Gly Val Cys Asp Lys Asp Gly Cys Gly Trp Asn Pro  
 225 230 235 240

Tyr Arg Val Asn Ile Thr Asp Tyr Tyr Gly Asn Ser Asp Ala Phe Arg  
 245 250 255

Val Asp Thr Arg Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Pro Ala Asp  
 260 265 270

Ala Glu Gly Arg Leu Glu Ser Ile His Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly  
 275 280 285

Lys Val Ile Glu Ser Tyr Val Val Asp Ala Pro Gly Leu Pro Arg Thr  
 290 295 300

Asp Ser Leu Asn Asp Glu Phe Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Arg Tyr  
 305 310 315 320

Leu Asp Leu Gly Gly Thr Ala Gly Met Gly Asp Ala Met Thr Arg Gly  
 325 330 335

Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe Met Asn  
 340 345 350

Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ala Gly Pro Cys Leu Pro Asp Glu Gly Asp  
 355 360 365

Pro Lys Asn Ile Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Glu Val Thr Tyr Ser  
 370 375 380

Asn Leu Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp  
 385 390 395 400

Asp Asp Gly Asp Gly Asp Asp Cys  
 405

<210> 7

<211> 2100

<212> DNA

<213> *Melanocarpus albomyces*

<400> 7

cccggctctgg agacggggag cgcgccagcg acgcaggata agaaggcgac gaccgcgcct 60  
 ccgagccagg cccaggacag caggagaact cgccacgcgc aagcagcacg cccgatcgac 120  
 agtgtcccgc tctgcccaca gactctgca accatgatga tgaagcagta cctccagtac 180  
 ctgcgggccc cgctgccgct cgtcggcctc gccgccggcc agcgcgctgg taacgagacg 240  
 cccgagaacc accccccgct cacctggcag aggtgcacgg ccccgggcaa ctgccagacc 300  
 gtgaacgccg aggtcgtcat tgacgccaac tggcgcctggc tgcacgacga caacatgcag 360  
 aactgctacg acggcaacca gtggaccaac gcctgcagca ccgccaccga ctgcgctgag 420  
 aagtgcacga tcgaggggtgc cggcgactac ctgggcacct acggcgcctc gaccagcggc 480  
 gacgcctga cgctcaagtt cgtcaccaag cacgagtacg gcaccaacgt cggctcgcgc 540  
 ttctacctca tgaacggccc ggacaagtac cagatgttca acctcatggg caacgagctt 600  
 gcctttgacg tcgacctctc gaccgtcgag tgcggcatca acagcgcctt gtacttcgtc 660  
 gccatggagg aggacggcgg catggccagc taccggagca accaggccgg cgcccggtac 720  
 ggcactgggg tgagttgagc tccgctttgt ttcgagtcgc aacgaggcac tttctgggcg 780  
 ccggctaact ctctcgattc ctccgacagt actgcgatgc ccaatgcgct cgtgatctca 840  
 agttcgttgg cggcaaggcc aacattgagg gctggaagtc gtccaccagc gacccaacg 900  
 ctggcgtcgg ccggtacggc agctgctgcg ctgagatcga cgtctggtga gtgcgagacc 960  
 gtccaccag gttcggatgc ggggtgaaa tttcgcggct aacggagcac ccccagga 1020  
 gtogaatgcc tatgccttcg ctttcacgcc gcacgcgtgc acgaccaacg agtaccacgt 1080  
 ctgcgagacc accaactgcg gtggcaccta ctccgaggac cgcttcgccg gcaagtgcga 1140  
 cgccaacggc tgcgactaca acccctaccg catgggcaac cccgacttct acggcaaggg 1200  
 caagacgctc gacaccagcc gcaagttcac gtgcgtgacc ccttgtggcg caacctttct 1260  
 ctgcctgcct ggacacactg aaactgacac gtcgttttcg gctgcagcgt cgtctcccgc 1320  
 ttcgaggaga acaagctctc ccagtacttc atccaggacg gccgcaagat cgagatcccc 1380  
 ccgccgacgt gggagggcat gcccaacagc agcgagatca ccccgagct ctgctccacc 1440

atgttcgatg tgttcaacga cgcgaaccgc ttcgaggagg tcggcggcctt cgagcagctg 1500  
 aacaacgccc tccgggttcc catggtcctc gtcattgtcca tctggggacga cgtaagtacc 1560  
 cgccgacctc cctagccaca caagccgcat ccggcgaggc acgccatcgc tgctgctaac 1620  
 acgagaccgt tcgtagcact acgccaacat gctctggctc gactccatct acccgcccga 1680  
 gaaggagggc cagcccggcg ccgcccgtgg cgactgcccc acggactcgg gtgtccccgc 1740  
 cgaggtcgag gctcagttcc ccgacgcgta agacttgccc ccgaccccaa gttccactt 1800  
 ctggatgccg aatgctaaca cgcgaaacag ccaggtcgtc tggccaaca tccgcttcgg 1860  
 ccccatcggc tcgacctagc acttctaagc cggtcctatc actcgcagcc ctgggcccgt 1920  
 cacgcccgcc acctcccctc gcggaactc tccgtgcgtc gcgggctcca aagcattttg 1980  
 gcctcaagtt tttttcgctc atgtttcagt tctttccgca tgtatcctaa gctccgatag 2040  
 caagagaaat tgccagtctg agttttggga acctgtgatc cacatcatgg acgcataatg 2100

<210> 8

<211> 430

<212> PRT

<213> *Melanocarpus albomyces*

<400> 8

Gln Arg Ala Gly Asn Glu Thr Pro Glu Asn His Pro Pro Leu Thr Trp  
 1 5 10 15

Gln Arg Cys Thr Ala Pro Gly Asn Cys Gln Thr Val Asn Ala Glu Val  
 20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Asp Asp Asn Met Gln Asn  
 35 40 45

Cys Tyr Asp Gly Asn Gln Trp Thr Asn Ala Cys Ser Thr Ala Thr Asp  
 50 55 60

Cys Ala Glu Lys Cys Met Ile Glu Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Gly Thr  
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ala Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr  
 85 90 95

Lys His Glu Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Asn  
 100 105 110

Gly Pro Asp Lys Tyr Gln Met Phe Asn Leu Met Gly Asn Glu Leu Ala  
 115 120 125

Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Val Glu Cys Gly Ile Asn Ser Ala Leu  
 130 135 140

Tyr Phe Val Ala Met Glu Glu Asp Gly Gly Met Ala Ser Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160

Asn Gln Ala Gly Ala Arg Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175

Ala Arg Asp Leu Lys Phe Val Gly Gly Lys Ala Asn Ile Glu Gly Trp  
 180 185 190

Lys Ser Ser Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Pro Tyr Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ala Glu Ile Asp Val Trp Glu Ser Asn Ala Tyr Ala Phe Ala  
 210 215 220

Phe Thr Pro His Ala Cys Thr Thr Asn Glu Tyr His Val Cys Glu Thr  
 225 230 235 240

Thr Asn Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Glu Asp Arg Phe Ala Gly Lys Cys  
 245 250 255

Asp Ala Asn Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Tyr Arg Met Gly Asn Pro Asp  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Lys Gly Lys Thr Leu Asp Thr Ser Arg Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Ser Arg Phe Glu Glu Asn Lys Leu Ser Gln Tyr Phe Ile Gln Asp  
 290 295 300

Gly Arg Lys Ile Glu Ile Pro Pro Pro Thr Trp Glu Gly Met Pro Asn  
 305 310 315 320

Ser Ser Glu Ile Thr Pro Glu Leu Cys Ser Thr Met Phe Asp Val Phe  
 325 330 335

Asn Asp Arg Asn Arg Phe Glu Glu Val Gly Gly Phe Glu Gln Leu Asn  
 340 345 350

Asn Ala Leu Arg Val Pro Met Val Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp  
 355 360 365

His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Pro Pro Glu Lys  
 370 375 380

Glu Gly Gln Pro Gly Ala Ala Arg Gly Asp Cys Pro Thr Asp Ser Gly  
 385 390 395 400

Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Gln Phe Pro Asp Ala Gln Val Val Trp  
 405 410 415

Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Tyr Asp Phe  
 420 425 430

<210> 9

<211> 3459

<212> DNA

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 9

gaattctaga cctttatcct ttcacccgac cagacttccc tttttgacct tggcgccctg 60  
 ttgactacct acctacctag gtagtaacgt cgctcgacct cttgaatgat ccttgtcaca 120  
 ctgcaaacat ccgaaaacat acggcaaaag atgattgggc atggatgcag gagacatoga 180  
 atgagggctt agaaggaaat gaaaacctgg gaccaggacg ctaggtacga tgaaatccgc 240  
 caatggtgaa actttaagtc gtgcctacag cacaggtctt gtgaagattg cgctgttcag 300  
 acttaatctt ctcacacag tccaagtctt tatgaaaagg aaaaagagag ggaagagcgc 360  
 tatttcgagc tgttggcctc atagggagac agtcgagcat accagcggta tcgacgttag 420  
 actcaaccaa gaataatgac gagaataaac acagaagtca accttgaact ggatagcagg 480  
 gttccagcag cagatagtta cttgcataaa gacaactccc cgagggtctt ctgcatacac 540  
 caggatgttc cggaattatt cactgctcgt ttccgacgtg gcgtcagtga tccgtctcca 600  
 cagaactcta cctgggaata acccagggga ggaatctgca agtaagaact taataccaat 660  
 ccccggggct gccgaggtga atcgaatctc ccgcgggaaa ttaaaccat acgatgtttt 720  
 tgcaccacat gcatgcttag cacgatttct ccgcaagga gtcacagaga aagacatatt 780  
 tcgcatacta ctgtgactct gcagagttac atatcactca ggatacattg cagatcattg 840  
 tccgggcatc aaaaatggac ctgcaggatc aacggcccga caaacacaa gtggctaaag 900  
 ctgggggatg cccgaaacct tctggtgcaa tatcatttga tggatgttcc cccgcattt 960  
 ctaagacatc gacggatcgg cccgcatact aatcctttta tcaacaaaaa gttccactcg 1020  
 actagagaaa aaaaaggcca aggccactag ttgcagtcgg atactggtct tttcgcgctc 1080  
 caacaccttc atccatgatc cccttagcca ccaatgcccc acataatata tgttgacata 1140  
 ggtacgtagc tctgttatcc aatcggatcc gaacctcttt aacggacccc tcctacacac 1200  
 cttatcctaa cttcagaaga ctggtgcccc ttggggattg aggaggtccg ggtcgcagga 1260  
 tgcgttctag gctaaattct cggccggtag ccatctcgaa tctctcgtga agccttcac 1320  
 tgaacggttg gcggcccgtc aagccgatga ccatgggttc ctgatagagc ttgtgcctga 1380

ccggccttgg cggcatagac gagctgaaca catcaggtat gaacagatca gatataaagt 1440  
 cggattgagt cctagtagca agcaatccgc caccaccaa tcaagcaacg agcgacacga 1500  
 ataacaatat caatcgaatc gcaatgtatc agcgcgctct tctcttctct ttcttctctg 1560  
 ccgcccggcg cgcgcacgag gccggtaccg taaccgcaga gaatcacctt tcctgacct 1620  
 ggcagcaatg ctccagggcg ggtagttgta ccacgcagaa tggaaaagtc gttatcgatg 1680  
 cgaactggcg ttgggtccat accacctctg gatacaccaa ctgctacacg ggcaatacgt 1740  
 gggacaccag tatctgtccc gacgacgtga cctgcgctca gaattgtgcc ttggatggag 1800  
 cggattacag tggcacctat ggtgttacga ccagtggcaa cgccctgaga ctgaactttg 1860  
 tcacccaaag ctccaggaag aacattggct cgcgcctgta cctgctgcag gacgacacca 1920  
 cttatcagat cttcaagctg ctgggtcagg agtttacctt cgatgtcgac gtctccaatc 1980  
 tccttgccg gctgaacggc gccctctact ttgtggccat ggacgcccac ggcaatttgt 2040  
 ccaaataacc tggcaacaag gcaggcgcta agtatggcac tggttactgc gactctcagt 2100  
 gccctcgga tctcaagttc atcaacggtc aggtacgtca gaagtataa ctaccagca 2160  
 gagcccatga atcattaact aacgctgtca aatacaggcc aacgttgaag gctggcagcc 2220  
 gtctgccaac gacccaaatg ccggcgttgg taaccacggt tcctcgtgcg ctgagatgga 2280  
 tgtctgggaa gccaacagca tctctactgc ggtgacgctt cacccatgcy acacccccgg 2340  
 ccagaccatg tgccagggag acgactgtgg tggaaacctc tcctcactc gatatgctgg 2400  
 tacctgcgac cctgatggct gcgacttcaa tccttaccag ccaggcaacc actcgttcta 2460  
 cggccccggg aagatcgtcg aactagctc caaattcacc gtcgtcacc agttcatcac 2520  
 cgacgacggg acaccctcgg gcaccctgac ggagatcaaa cgcttctacg tccagaacgg 2580  
 caaggtgatc ccccagtcgg agtcgacgat cagcggcgtc accggcaact caatcaccac 2640  
 cgagtattgc acggcccaga aggcagcctt cggcgacaac accggcttct tcacgcagcg 2700  
 cgggcttcag aagatcagtc aggtctctggc tcagggcagc gtctcgtca tgagcctgtg 2760  
 ggacgatcac gccgccaaca tgctctggct ggacagcacc taccgactg atgcggacc 2820  
 ggacaccctt ggcgtcgcgc gcggtacctg ccccacgacc tccggcgctc cggccgacgt 2880  
 tgagtcgag aacccaatt catatgttat ctactccaac atcaaggtcg gaccatcaa 2940  
 ctgcaccttc accgccaact aagtaagtaa cgggcactct accaccgaga gcttctgtaa 3000  
 gatacagggg tagttgggag attgtcgtgt acaggggaca tgcgatgctc aaaaatctac 3060  
 atcagtttgc caattgaacc atgaagaaaa gggggagatc aaagaagtct gtcagaagag 3120  
 aggggctgtg gcagcttaag ccttgttgta gatcgttcag agaaaaaaaa agtttgcgta 3180  
 cttattatat taggtcgatc attatccgat tgactccgtg acaagaatta aaaagagtac 3240  
 tgcttcttg cctatttaaa ttgttatata cgccgtagcg cttgcccacc accctcaca 3300  
 gtatatcggg tcgctcttct ttgtctcttc atctcacatc acaggtccag gtccagcccg 3360

gcccggtccg ggtgccatgc atgcacaggg ggactaatat attaatcgtg acctgtvcc 3420

taagctaggg tcctgcatt ttgaacctgt ggacgtctg 3459

<210> 10

<211> 440

<212> PRT

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 10

Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr Trp  
1 5 10 15

Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val  
20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr Thr  
35 40 45

Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp Asp  
50 55 60

Val Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Gly  
65 70 75 80

Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe Val  
85 90 95

Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu Gln  
100 105 110

Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe Thr  
115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu  
130 135 140

Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro Gly  
145 150 155 160

Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys  
165 170 175

Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp  
180 185 190

Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala  
 210 215 220

Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln Gly  
 225 230 235 240

Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr Cys  
 245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His Ser  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu Thr  
 290 295 300

Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln Ser  
 305 310 315 320

Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr  
 325 330 335

Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe Thr  
 340 345 350

His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met Val  
 355 360 365

Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp Leu  
 370 375 380

Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val Ala  
 385 390 395 400

Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser  
 405 410 415

Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro  
 420 425 430

Ile Asn Ser Thr Phe Thr Ala Asn  
 435 440

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Primer

<400> 11

tacgccatgg tcgtccagtc gaccagc

27

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Primer

<400> 12

tacgccatgg tcgtccagtc gaccagcagc ggcgg

35

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> Primer

<400> 13

tacgccatgg tcgtccagtc gaccagcagc ggcggcgacc tcggca

46

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Primer

<400> 14

cgtactcgag tcatcgcgag ggggccttga agacggcgaa

40

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Primer

<400>	15		
		tgactcgaga ccggtgcgtc aggetttcgc	30
<210>	16		
<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	Primer		
<400>	16		
		taggatccga gtcccattgg cagcaccggc aacc	34
<210>	17		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	Primer		
<400>	17		
		taggatccga gtccctagcgg cggcaaccct cccggc	36
<210>	18		
<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	Primer		
<400>	18		
		taggatccga gtcccattac cggcaaccct agcg	34
<210>	19		
<211>	55		
<212>	DNA		
<213>	Primer		
<400>	19		
		cgtactcgag tcatcgcgag ccgatggggc cgaaggcgaa gccgccgctc tcgtg	55
<210>	20		
<211>	52		

<212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 20  
 cgtactcgag tcatcgcgag ccgatctcgc cccagaagcc gccgctcgtcg tg 52  
  
 <210> 21  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 21  
 cgtactcgag tcatcgcgac gaggggatct ggacggcggg gaagccgccg tcgctcgtg 58  
  
 <210> 22  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 22  
 cgtactcgag tcatcgcgag ccgatctcgc cccaggcgaa gccgctcgtcg tc 52  
  
 <210> 23  
  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 23  
 tcgtctcgag tcgctgatgg gccgaagcgg atgttgg 37  
  
 <210> 24  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 24  
 ggagggcatg cccaacagca gcgagatcac c 31

<210>	25	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Primer	
<400>	25	
	cggcactagt tcgcgacccg atctcgcccc agcgcagg	38
<210>	26	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Primer	
<400>	26	
	cgccgagggc cggctcgaga gcatcc	26
<210>	27	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	Primer	
<400>	27	
	tgactcgaga ccggtgctgc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agagtaggca	60
	gggttcagg	69
<210>	28	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	Primer	
<400>	28	
	tgactcgaga ccggtgctgc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agaggcgtaa	60
	gggttcagg	69
<210>	29	
<211>	69	
<212>	DNA	

<213> Primer

<400> 29  
 tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agagtaccaa 60  
 gggttcagg 69

<210> 30

<211> 69

<212> DNA

<213> Primer

<400> 30  
 tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agaggcggca 60  
 gggttcagg 69

<210> 31

<211> 57

<212> DNA

<213> Primer

<400> 31  
 taggatccga gtcccattac cggcaaccct agcaccacca ccacccgccg cccagcc 57

<210> 32

<211> 60

<212> DNA

<213> Primer

<400> 32  
 taggatccga gtcccattac cggcaaccct agccctaccc agtctcacta cggccagtgc 60

<210> 33

<211> 45

<212> DNA

<213> Primer

<400> 33  
 tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc acggagcttt acagg 45

<210> 34  
 <211> 67  
 <212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 34  
 ttaaacaatatt gttatctact ccaacatcaa ggtcggaccc attggcagca cgggcaaccc 60  
 tagcggc 67  
  
 <210> 35  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 35  
 tatatgcggc cgcaccggtg cgtcaggcgtt tgcacggag ctttacagge 50  
  
 <210> 36  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Primer  
  
 <400> 36  
 ttggatccga gtcgcagcac cggcaaccct agcg 34  
  
 <210> 37  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> Melanocarpus albomyces  
  
 <400> 37  
 Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
 20 25 30  
 Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
 35 40 45  
 Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
 50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Phe  
195 200 205

<210> 38

<211> 207

<212> PRT

<213> *Melanocarpus albomyces*

<400> 38

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Trp  
195 200 205

<210> 39

<211> 208

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 39

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
 100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
 130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
 145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
 165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
 180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Pro Ala  
 195 200 205

<210> 40

<211> 208

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 40

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
 1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
 20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
 35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
 50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
 65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
 85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
 100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
 130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
 145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
 165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
 180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Trp  
 195 200 205

<210> 41

<211> 388

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 41

Gln Lys Pro Gly Glu Thr Pro Glu Val His Pro Gln Leu Thr Thr Phe  
 1 5 10 15

Arg Cys Thr Lys Ala Asp Gly Cys Gln Pro Arg Thr Asn Tyr Ile Val  
 20 25 30

Leu Asp Ser Leu Ser His Pro Val His Gln Val Asp Asn Asp Tyr Asn  
 35 40 45

Cys Gly Asp Trp Gly Gln Lys Pro Asn Ala Thr Ala Cys Pro Asp Val  
 50 55 60

Glu Ser Cys Ala Arg Asn Cys Ile Met Glu Gly Val Pro Asp Tyr Ser  
 65 70 75 80

Gln His Gly Val Thr Thr Ser Asp Thr Ser Leu Arg Leu Gln Gln Leu  
 85 90 95

Val Asp Gly Arg Leu Val Thr Pro Arg Val Tyr Leu Leu Asp Glu Thr  
 100 105 110

Glu His Arg Tyr Glu Met Met His Leu Thr Gly Gln Glu Phe Thr Phe  
 115 120 125

Glu Val Asp Ala Thr Lys Leu Pro Cys Gly Met Asn Ser Ala Leu Tyr  
 130 135 140

Leu Ser Glu Met Asp Pro Thr Gly Ala Arg Ser Glu Leu Asn Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Phe Val Thr  
 165 170 175

Pro Phe Ile Asn Gly Ile Gly Asn Ile Glu Gly Lys Gly Ser Cys Cys  
 180 185 190

Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Arg Ala Thr His Val Ala  
 195 200 205

Pro His Thr Cys Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Met Cys Glu Gly Ala Glu  
 210 215 220

Cys Glu Tyr Asp Gly Val Cys Asp Lys Asp Gly Cys Gly Trp Asn Pro  
 225 230 235 240

Tyr Arg Val Asn Ile Thr Asp Tyr Tyr Gly Asn Ser Asp Ala Phe Arg  
 245 250 255

Val Asp Thr Arg Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Pro Ala Asp  
 260 265 270

Ala Glu Gly Arg Leu Glu Ser Ile His Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly  
 275 280 285

Lys Val Ile Glu Ser Tyr Val Val Asp Ala Pro Gly Leu Pro Arg Thr  
 290 295 300

Asp Ser Leu Asn Asp Glu Phe Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Arg Tyr  
 305 310 315 320

Leu Asp Leu Gly Gly Thr Ala Gly Met Gly Asp Ala Met Thr Arg Gly  
 325 330 335

Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe Met Asn  
 340 345 350

Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ala Gly Pro Cys Leu Pro Asp Glu Gly Asp  
 355 360 365

Pro Lys Asn Ile Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Glu Val Thr Tyr Ser  
 370 375 380

Asn Leu Arg Trp  
 385

<210> 42  
 <211> 421  
 <212> PRT  
 <213> Melanocarpus albomyces  
  
 <400> 42  
 Gln Arg Ala Gly Asn Glu Thr Pro Glu Asn His Pro Pro Leu Thr Trp  
 1 5 10 15  
  
 Gln Arg Cys Thr Ala Pro Gly Asn Cys Gln Thr Val Asn Ala Glu Val  
 20 25 30  
  
 Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Asp Asp Asn Met Gln Asn  
 35 40 45  
  
 Cys Tyr Asp Gly Asn Gln Trp Thr Asn Ala Cys Ser Thr Ala Thr Asp  
 50 55 60  
  
 Cys Ala Glu Lys Cys Met Ile Glu Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Gly Thr  
 65 70 75 80  
  
 Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ala Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr  
 85 90 95  
  
 Lys His Glu Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Asn  
 100 105 110  
  
 Gly Pro Asp Lys Tyr Gln Met Phe Asn Leu Met Gly Asn Glu Leu Ala  
 115 120 125  
  
 Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Val Glu Cys Gly Ile Asn Ser Ala Leu  
 130 135 140  
  
 Tyr Phe Val Ala Met Glu Glu Asp Gly Gly Met Ala Ser Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160  
  
 Asn Gln Ala Gly Ala Arg Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175  
  
 Ala Arg Asp Leu Lys Phe Val Gly Gly Lys Ala Asn Ile Glu Gly Trp  
 180 185 190  
  
 Lys Ser Ser Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Pro Tyr Gly Ser  
 195 200 205  
  
 Cys Cys Ala Glu Ile Asp Val Trp Glu Ser Asn Ala Tyr Ala Phe Ala  
 210 215 220

Phe Thr Pro His Ala Cys Thr Thr Asn Glu Tyr His Val Cys Glu Thr  
 225 230 235 240

Thr Asn Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Glu Asp Arg Phe Ala Gly Lys Cys  
 245 250 255

Asp Ala Asn Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Tyr Arg Met Gly Asn Pro Asp  
 260 265 270  
 Phe Tyr Gly Lys Gly Lys Thr Leu Asp Thr Ser Arg Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Ser Arg Phe Glu Glu Asn Lys Leu Ser Gln Tyr Phe Ile Gln Asp  
 290 295 300

Gly Arg Lys Ile Glu Ile Pro Pro Pro Thr Trp Glu Gly Met Pro Asn  
 305 310 315 320

Ser Ser Glu Ile Thr Pro Glu Leu Cys Ser Thr Met Phe Asp Val Phe  
 325 330 335

Asn Asp Arg Asn Arg Phe Glu Glu Val Gly Gly Phe Glu Gln Leu Asn  
 340 345 350

Asn Ala Leu Arg Val Pro Met Val Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp  
 355 360 365

His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Pro Pro Glu Lys  
 370 375 380

Glu Gly Gln Pro Gly Ala Ala Arg Gly Asp Cys Pro Thr Asp Ser Gly  
 385 390 395 400

Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Gln Phe Pro Asp Ala Gln Val Val Trp  
 405 410 415

Ser Asn Ile Arg Phe  
 420

<210> 43

<211> 430

<212> PRT

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 43

Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr Trp  
 1 5 10 15

Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val  
 20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr Thr  
 35 40 45

Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp Asp  
 50 55 60

Val Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe Val  
 85 90 95

Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu Gln  
 100 105 110

Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe Thr  
 115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu  
 130 135 140

Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro Gly  
 145 150 155 160

Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys  
 165 170 175

Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp  
 180 185 190

Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala  
 210 215 220

Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln Gly  
 225 230 235 240

Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr Cys  
 245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His Ser  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu Thr  
 290 295 300

Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln Ser  
 305 310 315 320

Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr  
 325 330 335

Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe Thr  
 340 345 350  
 His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met Val  
 355 360 365

Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp Leu  
 370 375 380

Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val Ala  
 385 390 395 400

Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser  
 405 410 415

Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val  
 420 425 430

<210> 44

<211> 69

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 44

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr  
 50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 45

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 45

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Ala  
 50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 46

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 46

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr  
 50 55 60

Ala Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 47

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 47

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Trp  
 50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 48

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 48

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Ala  
 50 55 60

Ala Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 49

<211> 58

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 49

Thr Gly Asn Pro Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr  
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
 20 25 30

Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln  
 35 40 45

Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 50 55

<210> 50

<211> 42

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 50

Thr Gly Asn Pro Ser Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
 1 5 10 15

Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln  
 20 25 30

Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 35 40

## REIVINDICAÇÕES

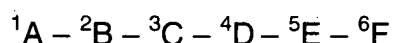
1. Proteína de fusão de celulase compreendendo

5 A. uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e

B. uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação de celulose (CBD) derivado de outra espécie,

10 em que uma região de junção foi introduzida entre a referida primeira seqüência de aminoácidos e a referida segunda seqüência de aminoácidos, por meio da qual uma proteína de fusão estável é obtida.

2. Proteína de fusão de celulase da reivindicação 1, em que a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



15 em que

${}^1A$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^1A$  é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

${}^2B$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente  ${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

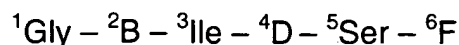
20  ${}^3C$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente  ${}^3C$  é Ile;

${}^4D$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^4D$  é Gly ou Pro;

25  ${}^5E$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente  ${}^5E$  é Ser; e

${}^6F$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente  ${}^6F$  é Ser ou está ausente; em que  ${}^1A$  está ligado na seqüência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e  ${}^6F$  está ligado na seqüência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

30 3. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 2, em que a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

<sup>2</sup>B é Pro, Gln, ou Glu;

<sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

<sup>5</sup>E é Ser; e

5 <sup>6</sup>F é Ser ou está ausente.

4. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 2, em que a região de junção tem a seguinte fórmula:

<sup>1</sup>Val – <sup>2</sup>Gln – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Pro – <sup>5</sup>Ser – <sup>6</sup>Ser.

10 5. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 2, em que a região de junção tem a fórmula:

<sup>1</sup>Gly – <sup>2</sup>Glu – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Gly – <sup>5</sup>Ser ou <sup>1</sup>Gly – <sup>2</sup>Pro – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Gly – <sup>5</sup>Ser.

15 6. Proteína de fusão de celulase, de qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos é de uma celulase neutra e a referida segunda seqüência de aminoácidos é de uma celulase ácida.

7. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 6, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos é da celulase da família 45 e a referida segunda seqüência de aminoácidos é da celulase da família 7.

20 8. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 6, em que a referida celulase neutra é de origem fúngica.

25 9. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 8, em que a referida celulase neutra é derivada do gênero de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, *Talaromyces* ou *Chaetomium*, preferivelmente de um *Melanocarpus sp*, mais preferivelmente de *Melanocarpus albomyces*.

30 10. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 9, em que a referida celulase é celulase 20K de *Melanocarpus albomyces*, celulase 50K, celulase 50KB ou um derivado seu.

11. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 9, em que a referida celulase é CBHI de *Thermoascus aurantiacus* ou

um derivado seu.

12. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 6, em que a referida celulase ácida é derivada de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, preferivelmente de *Trichoderma reesei*.

5 13. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 6, em que a referida celulase neutra é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 ou um derivado seu, e a segunda seqüência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* da SEQ ID NO: 4 ou um derivado seu.

10 14. Proteína de fusão de celulase, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos e/ou a referida segunda seqüência de aminoácidos é modificada.

15 15. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que na referida segunda seqüência de aminoácidos, o aminoácido tirosina na posição 492 (posição 31 do CBD) e/ou 493 (posição 32 do CBD) de CBHI de *Trichoderma reesei* maduro é substituído com um aminoácido alifático, preferivelmente com alanina, e/ou com um aminoácido aromático, preferivelmente com triptofano.

20 16. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 15, em que a referida segunda seqüência de aminoácidos, é selecionada de um grupo da SEQ ID NO: 45, 46, 47 e 48.

25 17. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que na referida segunda seqüência de aminoácidos, os aminoácidos 434 a 444 ou 434 a 460 da seqüência de CBHI de *Trichoderma reesei* maduro são anulados.

18. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 17, em que a referida segunda seqüência de aminoácidos é selecionada de um grupo da SEQ ID NO: 49 e 50.

30 19. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido valina na posição 208 da seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi anulado.

20. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido alanina na posição 207 da seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi anulado.

5 21. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido fenilalanina na posição 209 da seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi substituído com Trp.

10 22. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido contém uma prolina inserida depois da posição 206 na seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2.

15 23. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido é selecionado do grupo de SEQ ID NO: 37, 38, 39 e 40.

24. Proteína de fusão de celulase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, em que a referida proteína de fusão é estável.

20 25. Proteína de fusão de celulase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, em que uma preparação contendo a referida proteína de fusão foi adicionalmente estabilizada por tratamento com aquecimento.

26. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 1, em que a referida primeira celulase naturalmente não tem um CBD.

25 27. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 1, em que o CBD foi anulado da referida primeira celulase.

30 28. Vetor de expressão compreendendo uma primeira seqüência de polinucleotídeo codificando uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e uma segunda seqüência de polinucleotídeo codificando uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou um domínio de ligação de celulose (CBD) derivado de outra espécie, e um polinucleotídeo que codifica uma região de junção conectando as referidas pri-

meira e segunda seqüências de polinucleotídeo, as referidas seqüências de polinucleotídeo codificando as respectivas seqüências de aminoácidos conforme especificamente definido acima.

5 29. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 28, em que a primeira seqüência de polinucleotídeo codifica um núcleo de celulase neutro e a referida segunda seqüência de polinucleotídeo codifica um ligante e/ou um domínio de ligação de celulose (CBD) de uma celulase ácida.

10 30. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 29, em que a referida celulase neutra é derivada do gênero de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, *Talaromyces* ou *Chaetomium*, preferivelmente de um *Melanocarpus sp.*, mais preferivelmente de *Melanocarpus albomyces*.

15 31. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 30, e que a referida celulase é celulase 20K de *Melanocarpus albomyces*, celulase 50K, celulase 50KB ou um derivado seu.

32. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 30, em que a referida celulase é CBHI de *Thermoascus aurantiacus*.

20 33. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 28, em que a referida celulase ácida é derivada de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, preferivelmente de *Trichoderma reesei*.

25 34. Vetor de expressão de celulase, de acordo com a reivindicação 28, em que a referida celulase neutra é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 1 ou um derivado seu, e a segunda seqüência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei* da SEQ ID NO: 3 ou um derivado seu.

35. Vetor de expressão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 34, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos e/ou a referida segunda seqüência de aminoácidos é modificada.

30 36. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 35, em que a referida segunda seqüência de polinucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 45, 46, 47 e 48.

37. Vetor de expressão de 35, em que a referida segunda seqüência de polinucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 49 e 50.

5 38. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 35, em que a referida primeira seqüência de polinucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 37, 38, 39 e 40.

39. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 28, em que a referida primeira seqüência de polinucleotídeo codifica uma celulase, a qual naturalmente não tem um CBD.

10 40. Célula hospedeira compreendendo um vetor de expressão conforme definido em qualquer uma das reivindicações 28 a 39.

41. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 40, a qual é de origem fúngica.

15 42. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 41, a qual pertence ao fungo filamentoso.

43. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, a qual pertence ao gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

44. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 43, a qual é *Trichoderma reesei*.

20 45. Processo para a produção de uma proteína de fusão de celulase, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 27, compreendendo os passos de cultivar a célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 41 a 44 e a recuperação da proteína do meio de cultura.

25 46. Preparação de enzima, compreendendo uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 27.

30 47. Processo para desbotamento, o qual compreende o passo de adicionar uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 27 ou a preparação da reivindicação 46 a peças de vestuário ou tecido contendo algodão.

48. Processo, de acordo com a reivindicação 47, em que o tecido ou peças de vestuário é sarja de Nimes.

49. Processo para bioacabamento, o qual compreende o passo de adicionar uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 27, ou o preparo da reivindicação 46 para materiais têxteis como tecidos ou peças de vestuário ou fios.

5 50. Processo, de acordo com a reivindicação 49, em que os materiais têxteis são produzidos a partir de celulose natural contendo fibras ou fibras contendo celulose domésticas ou são misturas destes.

10 51. Processos, de acordo com a reivindicação 49, em que os materiais têxteis são misturas de fibras sintéticas e de fibras contendo celulose.

52. Composição detergente compreendendo uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 27 ou a preparação de enzima da reivindicação 46 e adjuvantes, tais como agentes ativos de superfície, tensoativos, agentes alvejantes ou abrasivos.

15 53. Método de tratamento de fibra celulósica, contendo material têxtil, em que o referido método compreende o contato do referido material têxtil com a composição detergente da reivindicação 52.

20 54. Método para tratar fibra ou polpa derivada de madeiram i qual compreende o passo de adicionar uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 27 ou o preparo da reivindicação 46 para polpa química ou mecânica derivada de madeira ou fibra secundária.

25 55. Método para melhorar a qualidade de ração animal, o qual compreende o tratamento do material vegetal com uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 27 ou o preparo da reivindicação 46.

Fig. 1

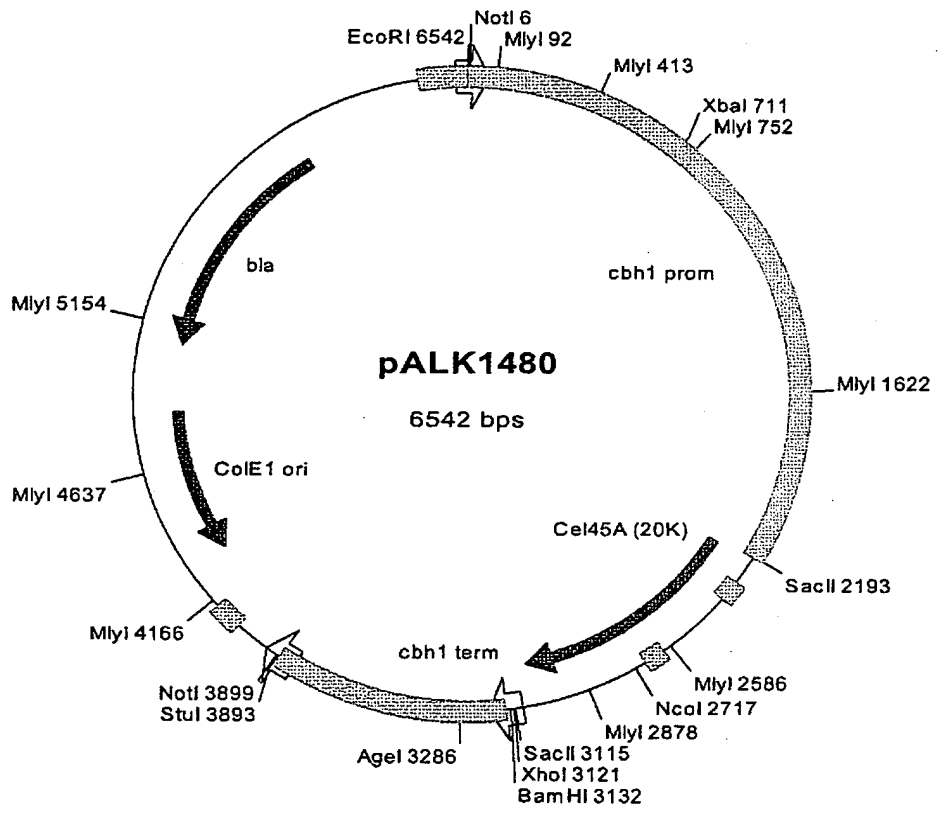


Fig. 2

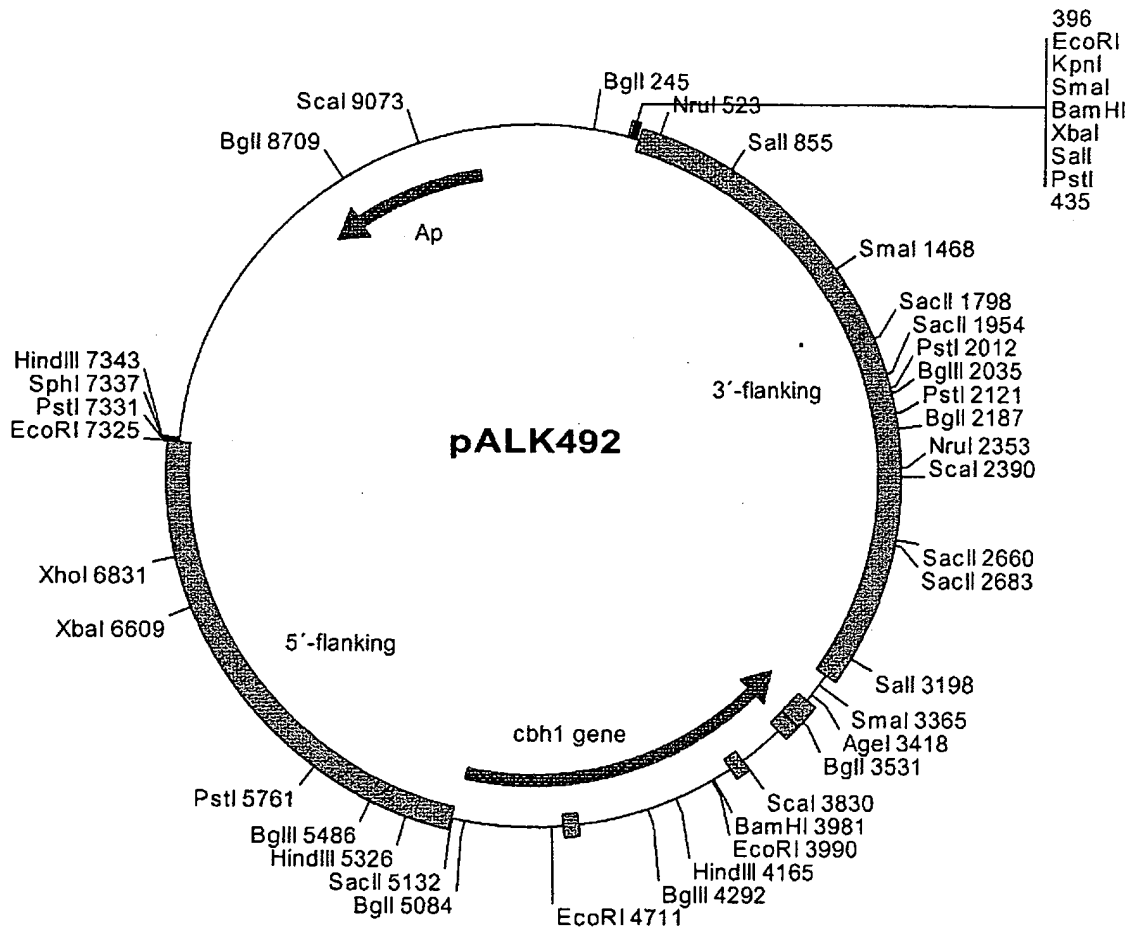


Fig. 3

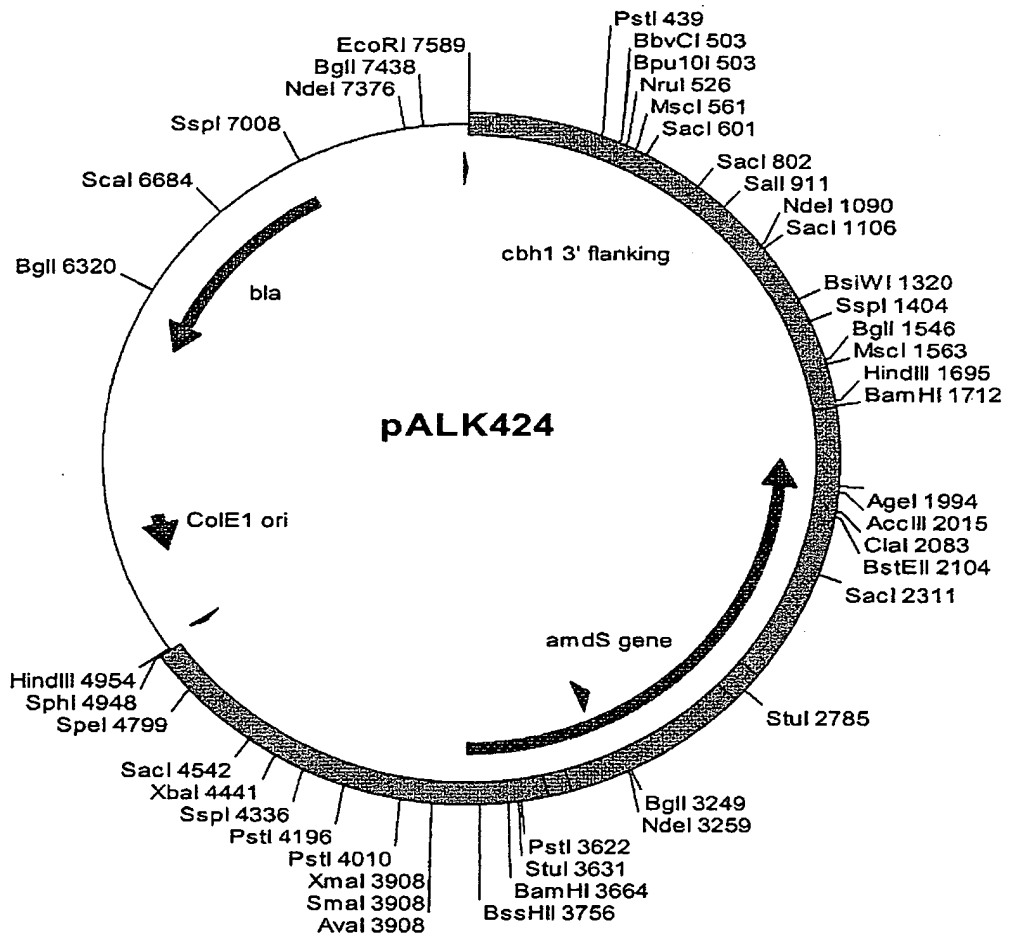


Fig. 4

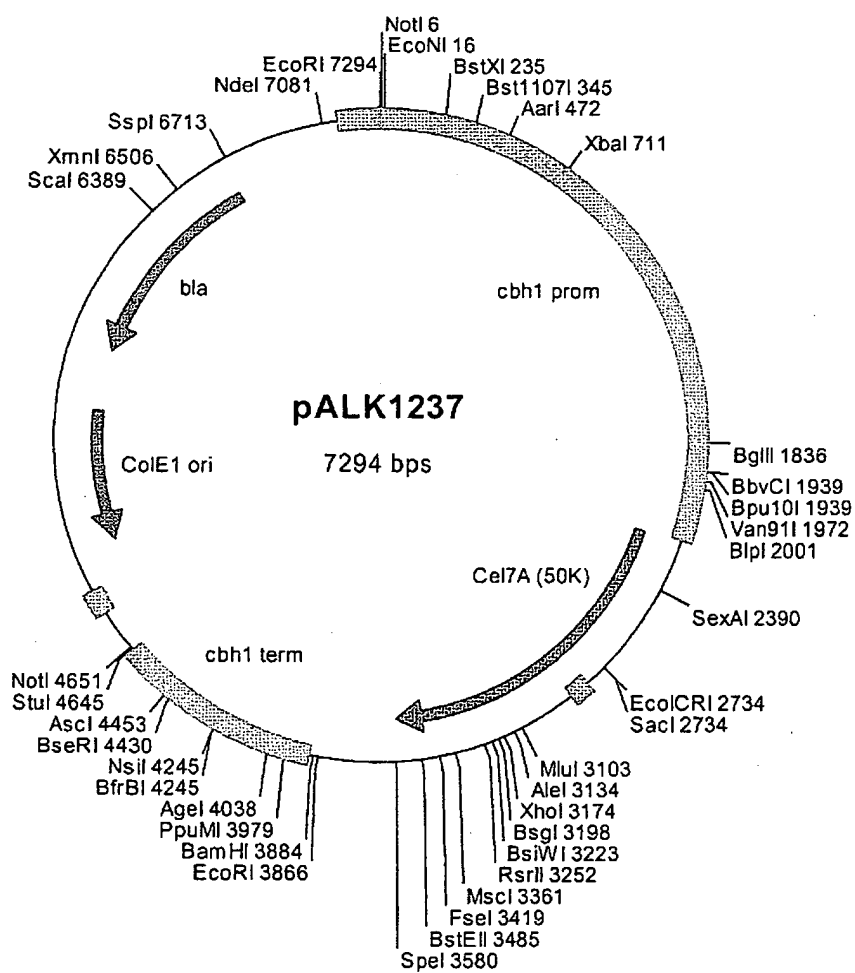


Fig. 5

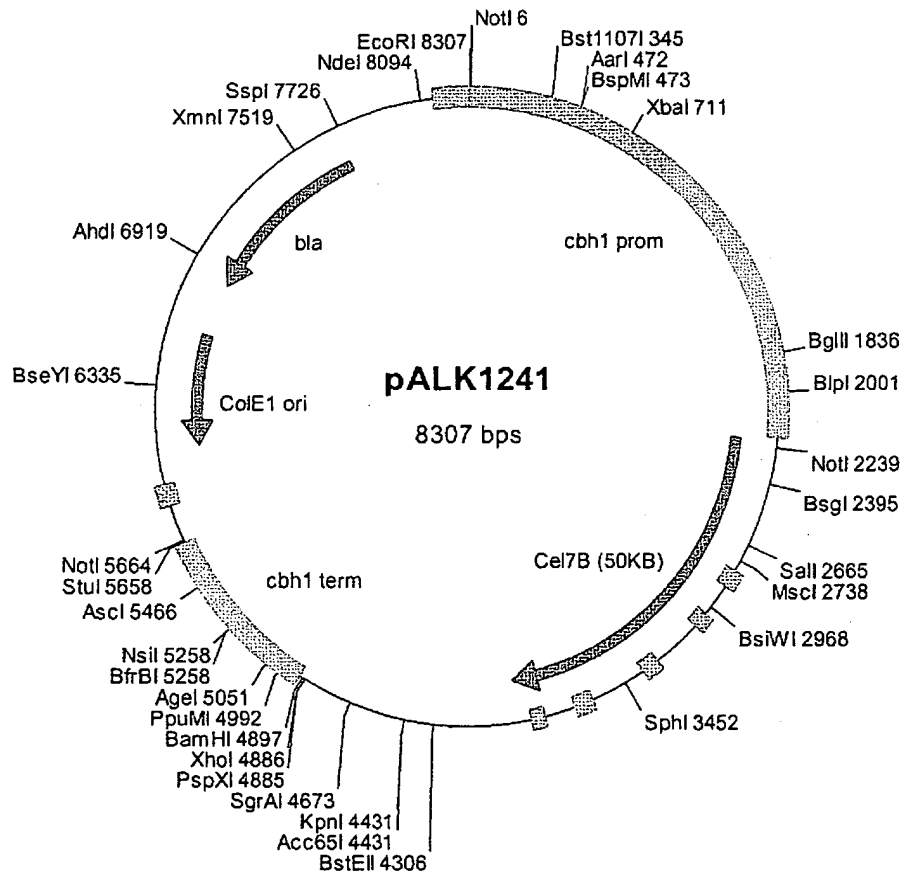


Fig. 6

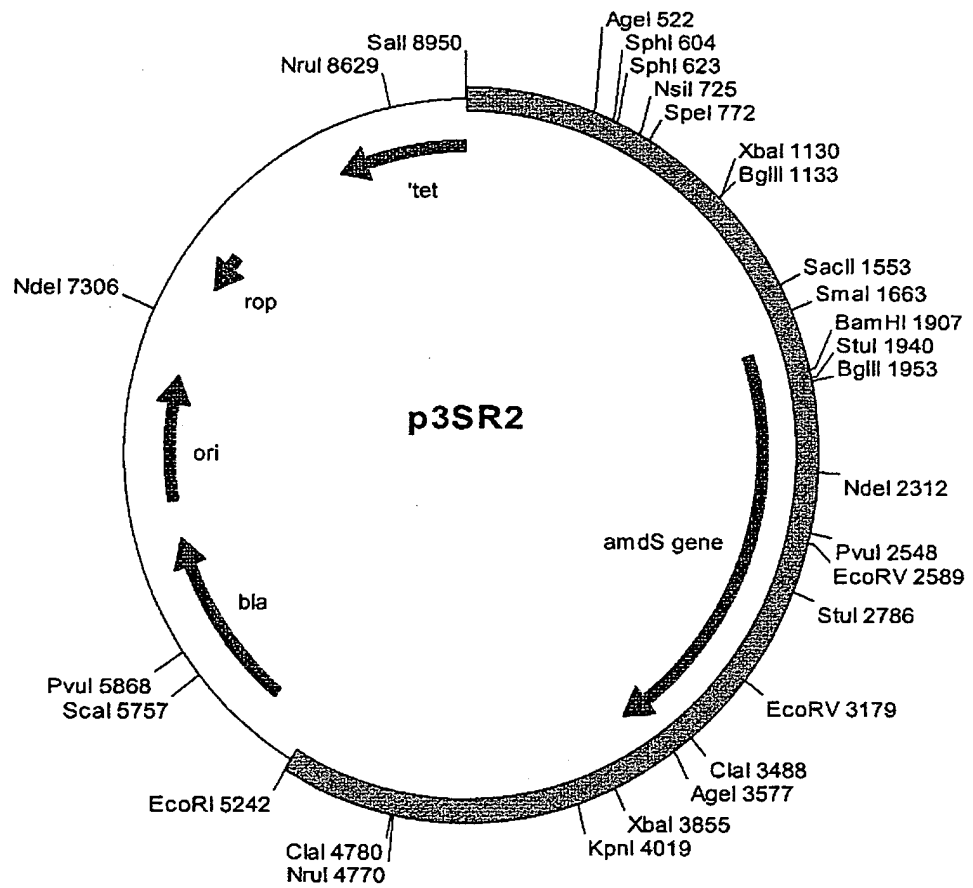


Fig. 7

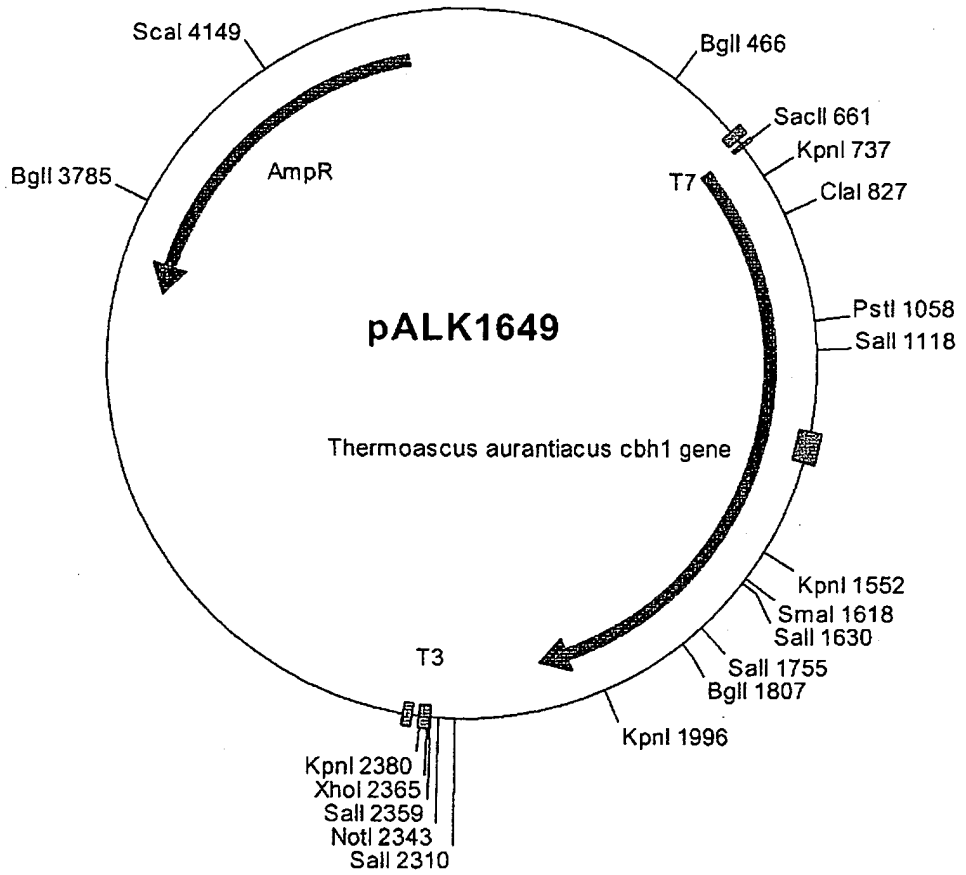


Fig. 8

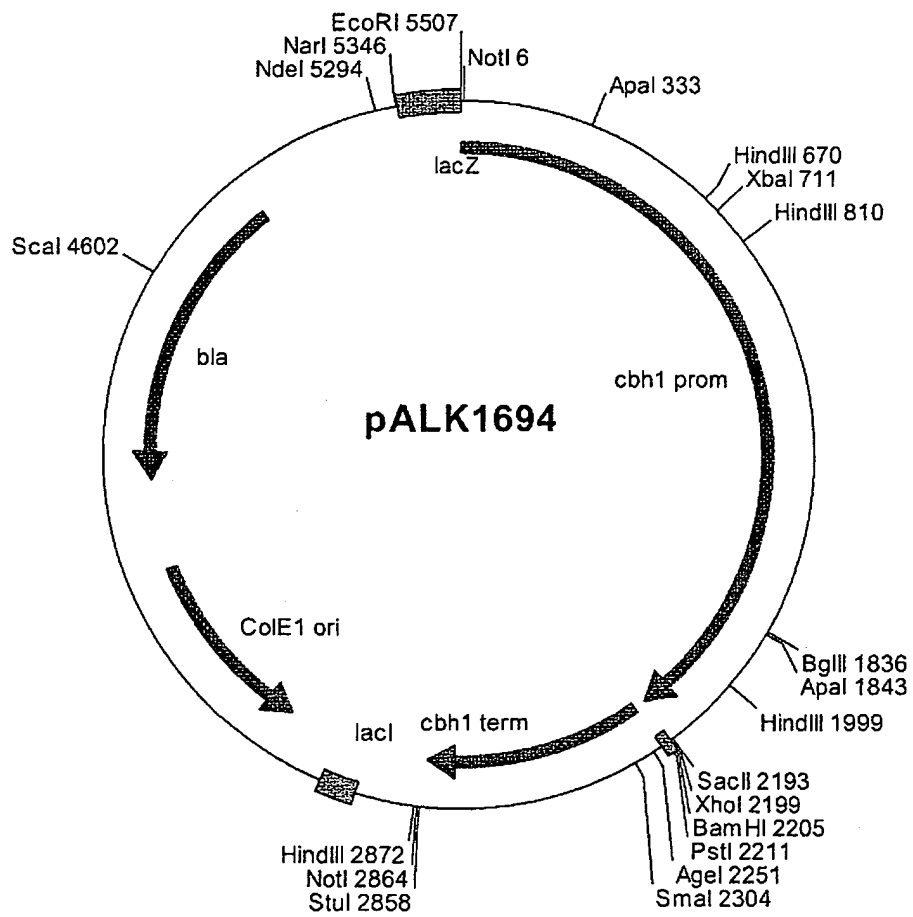
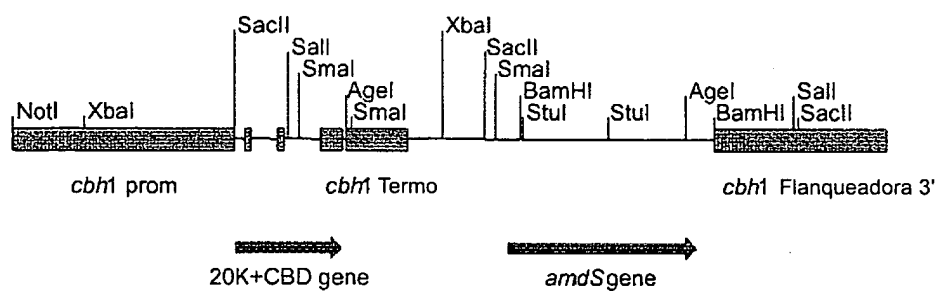


Fig. 9

A)



B)

Proteína de fusão CBD + 20K

*M. albomyces*

20K

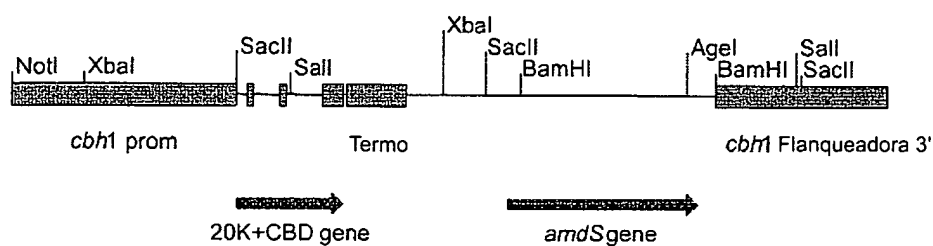
*T. reesei* CBHI

Ligante CBD

pALK1434: D G G F A V F K A P S G S T G N P S...T<sup>1</sup> Q ... Y Y S Q C LpALK1435: D G G F A V F K A P S G G N...T<sup>1</sup> Q ... Y Y S Q C L

Fig. 10

A)



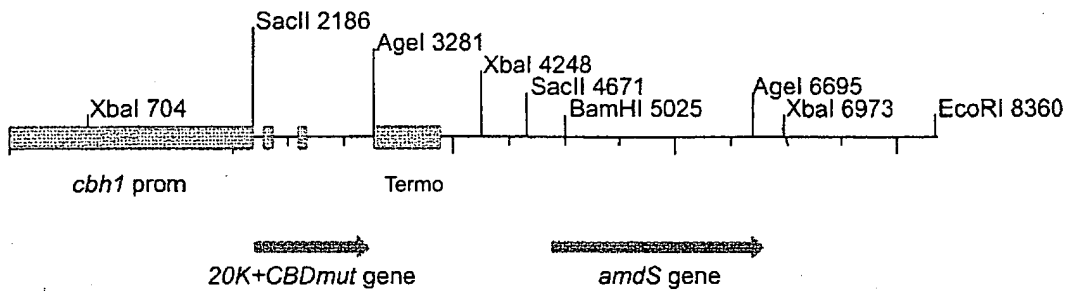
B)

Proteína de fusão CBD + 20K

	<i>M. albomyces</i>		<i>T. reesei</i>	CBHI
	20K	Junção	Ligante	CBD
pALK1768:	D G G F A F G P I G S T G <u>N P S...</u>	T <sup>1</sup>	Q ...	Y Y S Q C L
pALK1769:	D G G F W G E I G S T G <u>N P S...</u>	T <sup>1</sup>	Q ...	Y Y S Q C L
pALK1770:	D G G F P A V Q I P S S T G <u>N P S...</u>	T <sup>1</sup>	Q ...	Y Y S Q C L
pALK1775:	D G G F A W G E I G S T G <u>N P S...</u>	T <sup>1</sup>	Q ...	Y Y S Q C L

Fig. 11

A)



B)

Proteína de fusão CBD<sub>mut</sub> + 20K

*M. albomyces*  
20K Junção

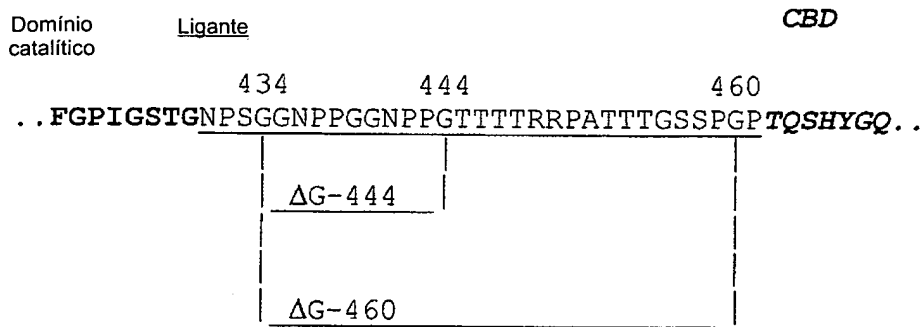
*T. reesei* CBHI  
Ligante CBD

D G G F P A V Q I P S S T G N P S... T<sup>1</sup> Q S H Y... N P Y<sup>31</sup> Y<sup>32</sup> S Q C L

pALK1877: N P A<sup>31</sup> Y<sup>32</sup> S Q C L  
 pALK1878: N P Y<sup>31</sup> A<sup>32</sup> S Q C L  
 pALK1879: N P W<sup>31</sup> Y<sup>32</sup> S Q C L  
 pALK1880: N P A<sup>31</sup> A<sup>32</sup> S Q C L

Fig. 12

A)



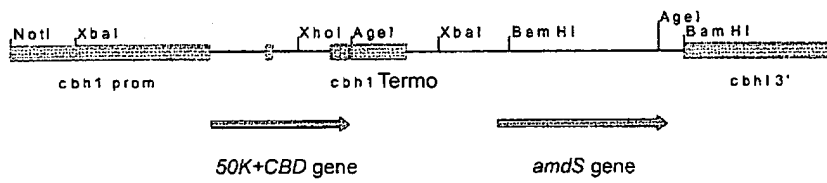
B)

Anulações de ligante CBD + 20K

<i>M. albomyces</i>	20K	Junção	<i>T. reesei</i> CBHI	Ligante	CBD
pALK1893:DGGF	PAVQIPSS	TGNPSTTTTRRPATTTGSSPGPT <sup>1</sup> Q...	P	Y <sup>31</sup> Y <sup>32</sup>	S Q C L
pALK1896:DGGF	PAVQIPSS	TGNPSP	T <sup>1</sup> Q...	P	Y <sup>31</sup> Y <sup>32</sup> S Q C L
pALK1899:DGGF	PAVQIPSS	TGNPSTTTTRRPATTTGSSPGPT <sup>1</sup> Q...	P	A <sup>31</sup> A <sup>32</sup>	S Q C L
pALK1952:DGGF	PAVQIPSS	TGNPSP	T <sup>1</sup> Q...	P	A <sup>31</sup> A <sup>32</sup> S Q C L

Fig. 13

A)



B)

*Melanocarpus albomyces* Proteína de fusão 50K

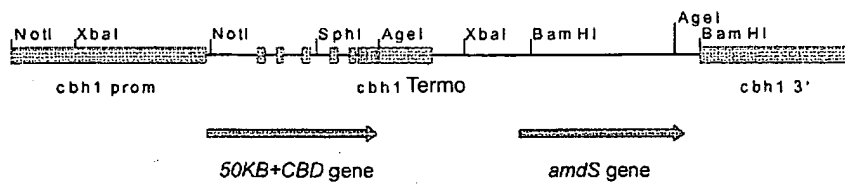
*M. albomyces*  
50K

*T. reesei* CBHI  
Ligante CBD

N L R W G E I G S T G N P S ...<sup>T1</sup> Q S H Y... N P Y Y S Q C L

Fig. 14

A)



B)

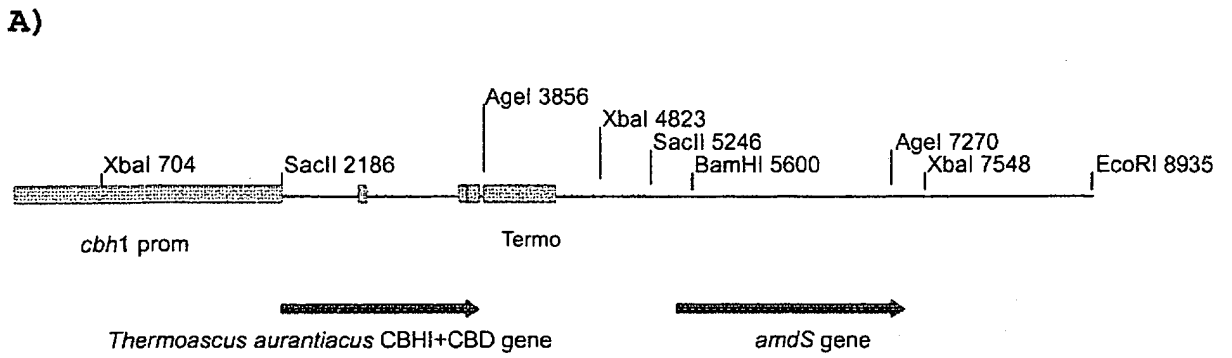
*Melanocarpus albomyces* Proteína de fusão 50K

*M. albomyces*  
50KB

*T. reesei* CBHI  
Ligante CBD

N I R F G P I G S T G N P S ...<sup>T1</sup> Q S H Y... N P Y Y S Q C L

Fig. 15



B)

*Thermoascus aurantiacus* Proteína de fusão CBHI + CBD

<i>T. aurantiacus</i>		<i>T. reesei</i> CBHI
CBHI		CBD
	Junção	Ligante

N I K V G P I G S T G N P S... T<sup>1</sup> Q S H Y... N P Y Y S Q C L

Fig. 16

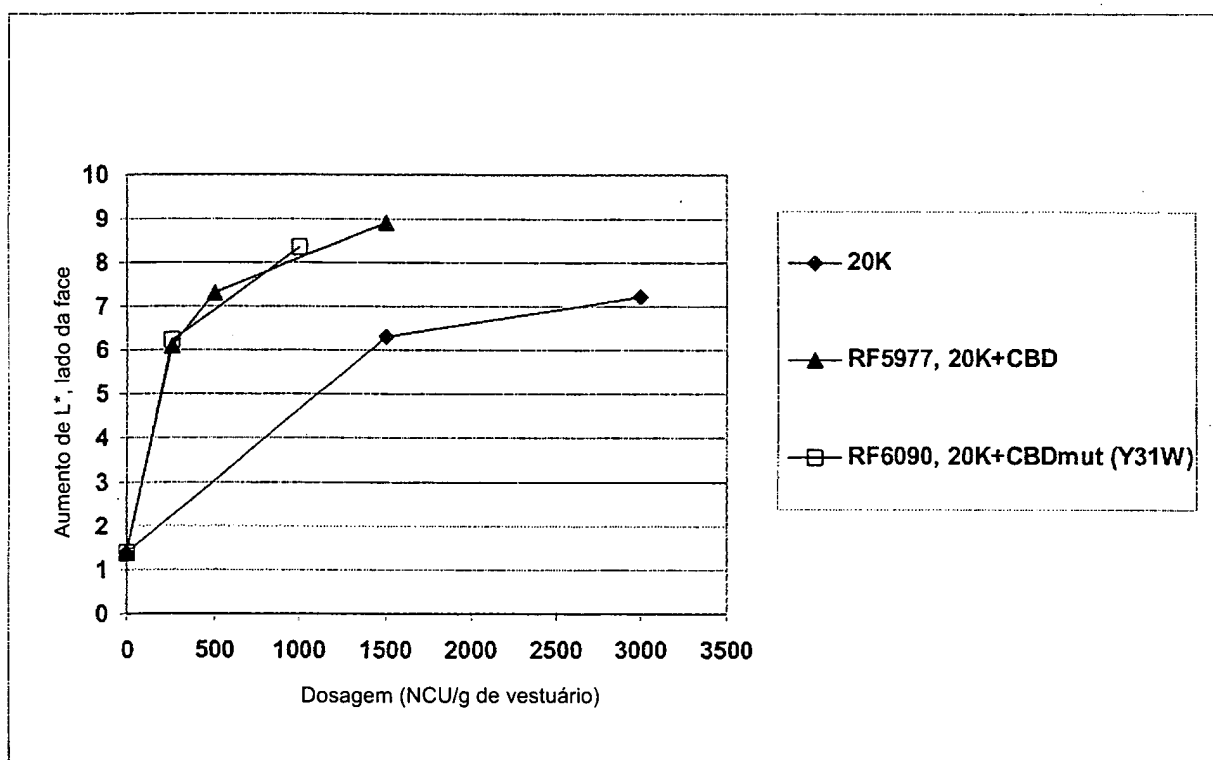
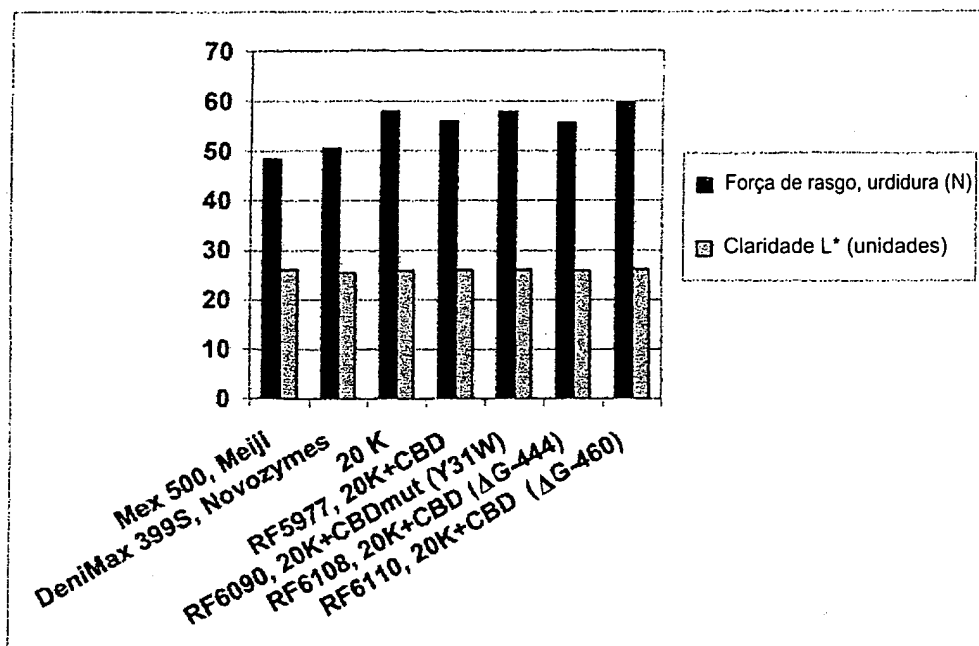


Fig 17

A



B

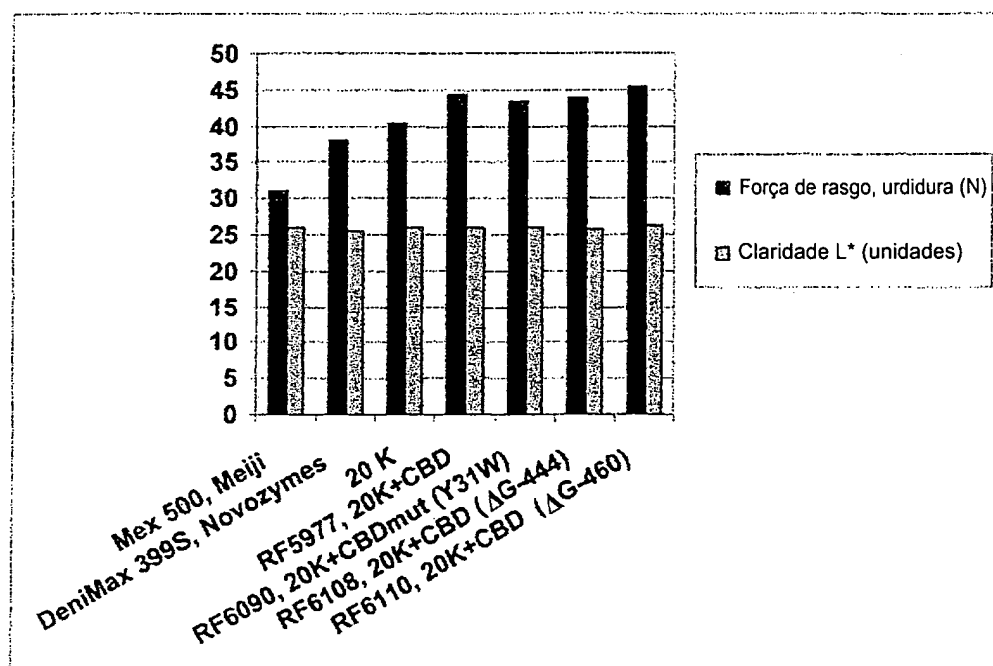


Fig. 18

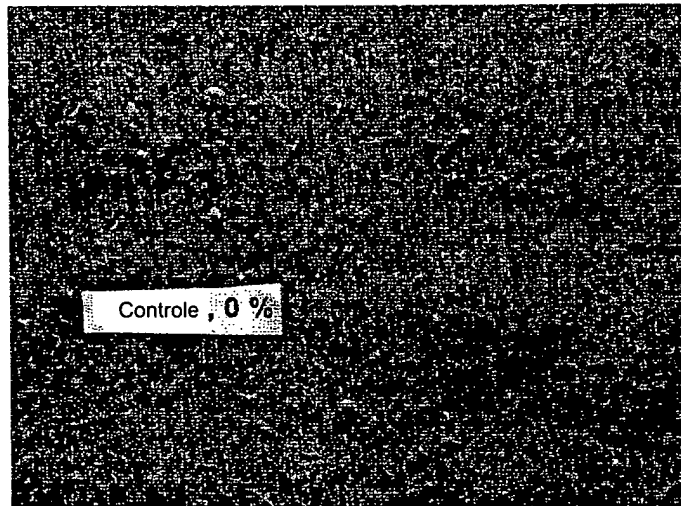
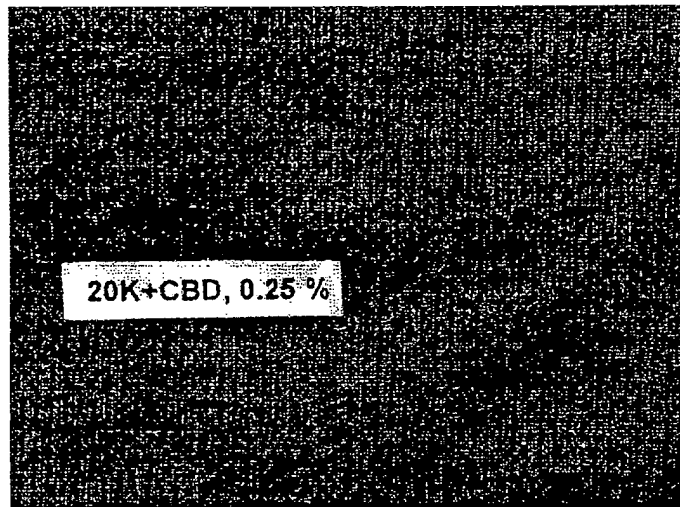


Fig. 19 A

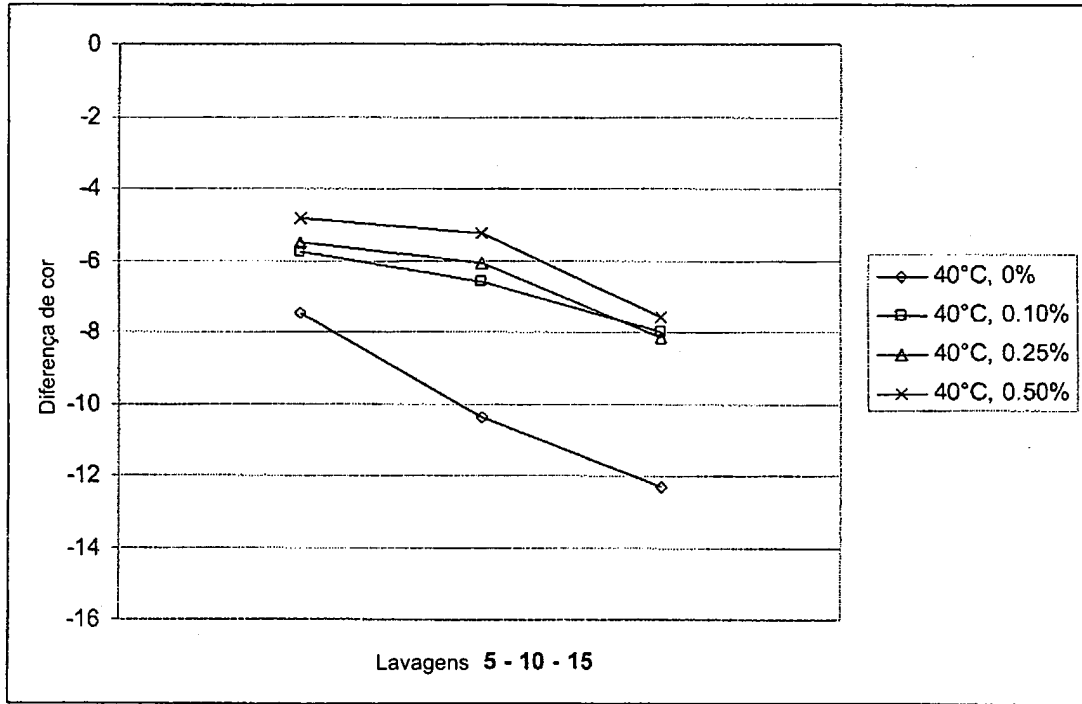


Fig. 19 B

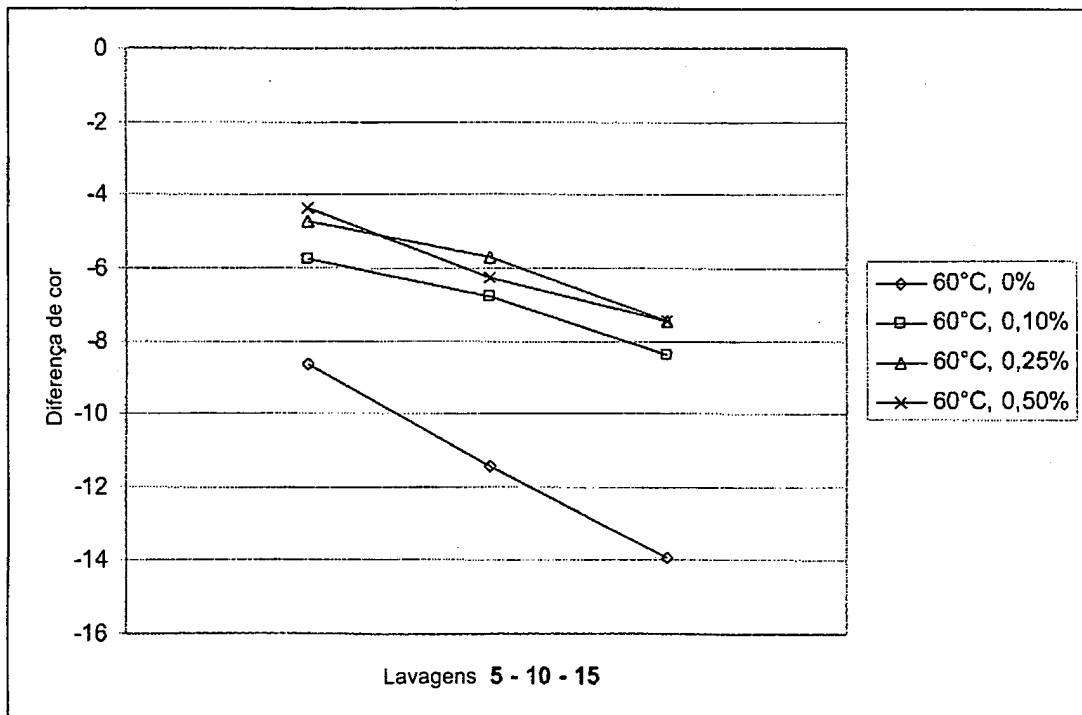


Fig. 20 A

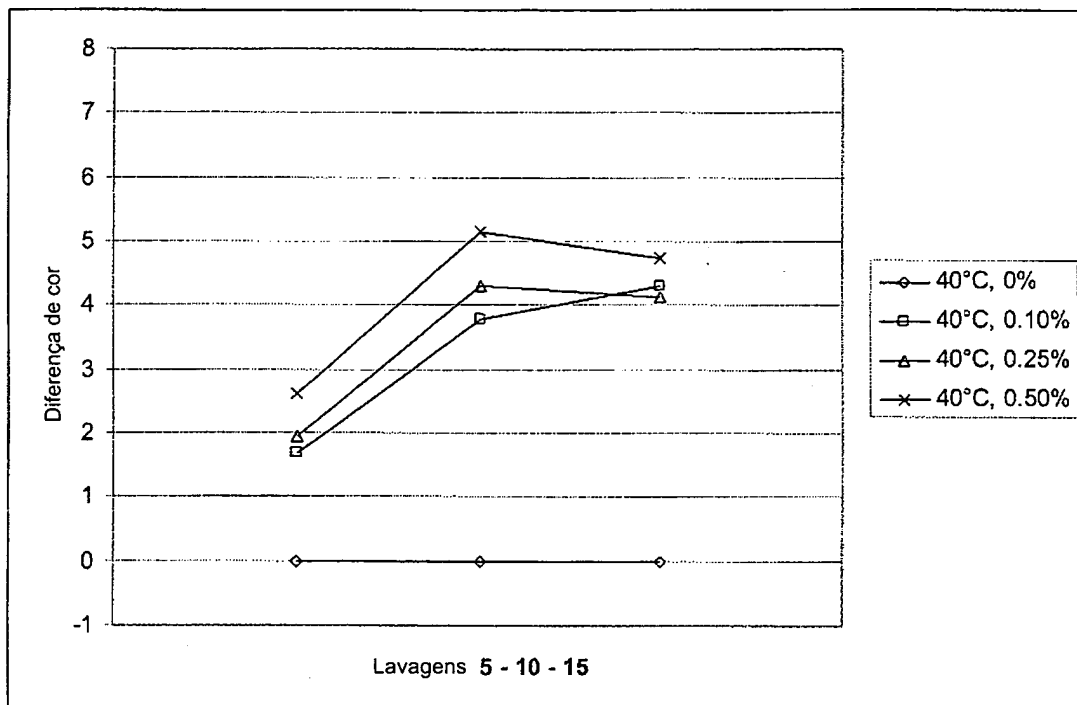
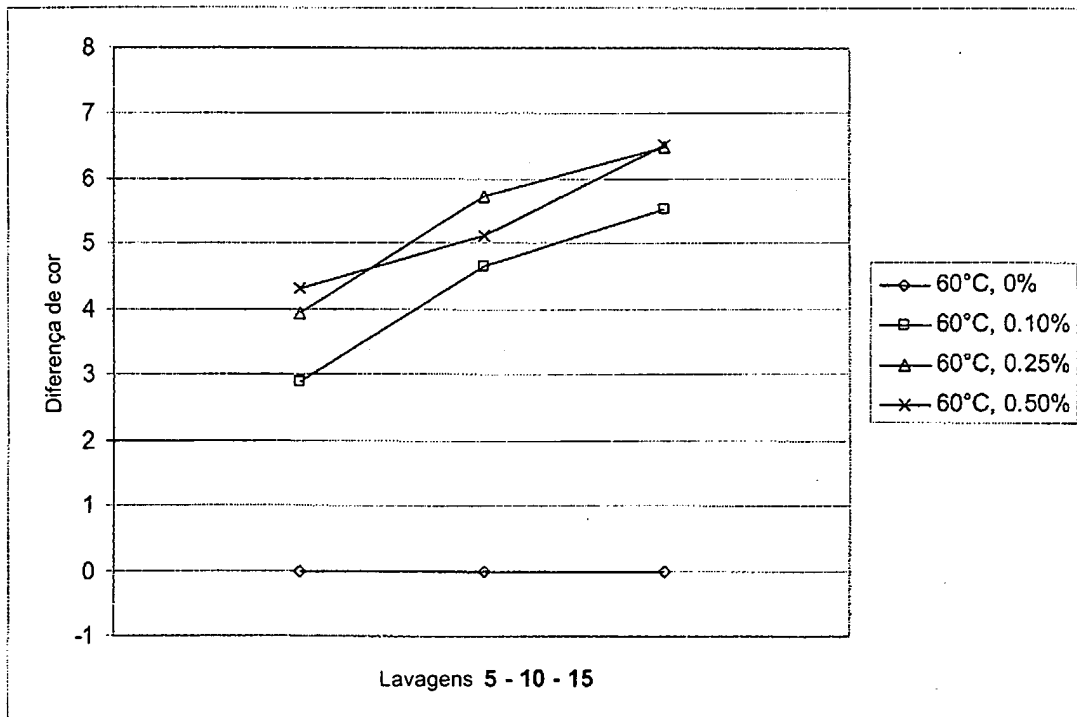


Fig. 20 B



## RESUMO

Patente de Invenção: "**CELULASES MELHORADAS**".

A presente invenção fornece novas proteínas de fusão de celulase, preparações de proteínas de fusão de celulase e composições de proteínas de fusão de celulase. A presente invenção fornece ainda vetores de expressão de celulase, células hospedeiras expressando celulase e métodos para preparar tais vetores e células. Os usos de celulases, preparações de celulase e composições de celulase nas indústrias têxtil, de detergente, polpa e papel também são fornecidos.

Novo quadro reivindicatório 1-54 (total de 54 reivindicações),  
incorporando as emendas às reivindicações, conforme Relatório de Exame  
Preliminar.

## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão de celulase compreendendo

A. uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivada de uma espécie, e

B. uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação de celulose (CBD) derivada de outra espécie,

em que a referida primeira seqüência de aminoácidos e a referida segunda seqüência de aminoácidos estão conectadas por uma região de junção com a seguinte fórmula geral:



em que

${}^1A$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^1A$  é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

${}^2B$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente  ${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

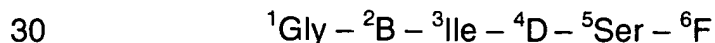
${}^3C$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente  ${}^3C$  é Ile;

${}^4D$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^4D$  é Gly ou Pro;

${}^5E$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente  ${}^5E$  é Ser; e

${}^6F$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente  ${}^6F$  é Ser ou está ausente; em que  ${}^1A$  está ligado na seqüência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e  ${}^6F$  está ligado na seqüência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

2. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 1, em que a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

<sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

<sup>5</sup>E é Ser; e

<sup>6</sup>F é Ser ou está ausente.

3. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 5 1, em que a região de junção tem a seguinte fórmula:

<sup>1</sup>Val – <sup>2</sup>Gln – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Pro – <sup>5</sup>Ser – <sup>6</sup>Ser.

4. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 1, em que a região de junção tem a fórmula:

<sup>1</sup>Gly – <sup>2</sup>Glu – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Gly – <sup>5</sup>Ser ou <sup>1</sup>Gly – <sup>2</sup>Pro – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Gly – <sup>5</sup>Ser.

10 5. Proteína de fusão de celulase, de qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos é de uma celulase neutra e a referida segunda seqüência de aminoácidos é de uma celulase ácida.

6. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 15 5, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos é da celulase da família 45 e a referida segunda seqüência de aminoácidos é da celulase da família 7.

7. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 5, em que a referida celulase neutra é de origem fúngica.

20 8. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 7, em que a referida celulase neutra é derivada do gênero de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, *Talaromyces* ou *Chaetomium*, preferivelmente de um *Melanocarpus sp*, mais preferivelmente de *Melanocarpus albomyces*.

9. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 8, em que a referida celulase é celulase 20K de *Melanocarpus albomyces*, celulase 50K, celulase 50KB ou um derivado seu.

30 10. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 8, em que a referida celulase é CBHI de *Thermoascus aurantiacus* ou um derivado seu.

11. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindica-

ção 5, em que a referida celulase ácida é derivada de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, preferivelmente de *Trichoderma reesei*.

12. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 5, em que a referida celulase neutra é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 ou um derivado seu, e a segunda seqüência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* da SEQ ID NO: 4 ou um derivado seu.

13. Proteína de fusão de celulase, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos e/ou a referida segunda seqüência de aminoácidos é modificada.

14. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 13, em que na referida segunda seqüência de aminoácidos, o aminoácido tirosina na posição 492 (posição 31 do CBD) e/ou 493 (posição 32 do CBD) de CBHI de maduro *Trichoderma reesei* é substituído com um aminoácido alifático, preferivelmente com alanina, e/ou com um aminoácido aromático, preferivelmente com triptofano.

15. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 14, em que a referida segunda seqüência de aminoácidos, é selecionada de um grupo da SEQ ID NO: 45, 46, 47 e 48.

16. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 13, em que na referida segunda seqüência de aminoácidos, os aminoácidos 434 a 444 ou 434 a 460 da seqüência de CBHI de *Trichoderma reesei* maduro são anulados.

17. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 12, em que a referida segunda seqüência de aminoácidos é selecionada de um grupo da SEQ ID NO: 49 e 50.

18. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 13, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido valina na posição 208 da seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi anulado.

19. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 13, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoáci-

do alanina na posição 207 da seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi anulado.

20. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 13, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido fenilalanina na posição 209 da seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi substituído com Trp.

21. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 13, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido contém uma prolina inserida depois da posição 206 na seqüência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2.

22. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 13, em que na referida primeira seqüência de aminoácidos, o aminoácido é selecionado do grupo de SEQ ID NO: 37, 38, 39 e 40.

23. Proteína de fusão de celulase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, em que a referida proteína de fusão é estável.

24. Proteína de fusão de celulase, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, em que uma preparação contendo a referida proteína de fusão foi adicionalmente estabilizada por tratamento com aquecimento.

25. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 1, em que a referida primeira celulase naturalmente não tem um CBD.

26. Proteína de fusão de celulase, de acordo com a reivindicação 1, em que o CBD foi anulado da referida primeira celulase.

27. Vetor de expressão compreendendo uma primeira seqüência de polinucleotídeo codificando uma primeira seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e uma seqüência de polinucleotídeo codificando uma segunda seqüência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou um domínio de ligação de celulose (CBD) derivado de outra espécie, e uma seqüência de polinucleotídeo que codifica uma região de junção conectando as referidas primeira e segunda seqüências de aminoácidos, a referida região de junção com a seguinte fórmula geral:

<sup>1</sup>A – <sup>2</sup>B – <sup>3</sup>C – <sup>4</sup>D – <sup>5</sup>E – <sup>6</sup>F

em que

<sup>1</sup>A é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente <sup>1</sup>A é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

5           <sup>2</sup>B é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente <sup>2</sup>B é Pro, Gln, ou Glu;

<sup>3</sup>C é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente <sup>3</sup>C é Ile;

10           <sup>4</sup>D é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente <sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

<sup>5</sup>E é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente <sup>5</sup>E é Ser; e

15           <sup>6</sup>F é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente <sup>6</sup>F é Ser ou está ausente; em que <sup>1</sup>A está ligado na seqüência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e <sup>6</sup>F está ligado na seqüência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

20           28. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 27, em que a primeira seqüência de polinucleotídeo codifica um núcleo de celulase neutro e a referida segunda seqüência de polinucleotídeo codifica um ligante e/ou um domínio de ligação de celulose (CBD) de uma celulase ácida.

25           29. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 28, em que a referida celulase neutra é derivada do gênero de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, *Talaromyces* ou *Chaetomium*, preferivelmente de um *Melanocarpus sp*, mais preferivelmente de *Melanocarpus albomyces*.

30           30. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 29, e que a referida celulase é celulase 20K de *Melanocarpus albomyces*, celulase 50K, celulase 50KB ou um derivado seu.

30           31. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 29, em que a referida celulase é CBHI de *Thermoascus aurantiacus*.

32. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 27, em

que a referida celulase ácida é derivada de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, preferivelmente de *Trichoderma reesei*.

33. Vetor de expressão de celulase, de acordo com a reivindicação 27, em que a referida celulase neutra é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* codificada pela SEQ ID NO: 1 ou um derivado seu, e a segunda seqüência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* codificada pela SEQ ID NO: 3 ou um derivado seu.

34. Vetor de expressão, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 27 a 33, em que a referida primeira seqüência de aminoácidos e/ou a referida segunda seqüência de aminoácidos é modificada.

35. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 34, em que a referida segunda seqüência de polinucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 45, 46, 47 e 48.

36. Vetor de expressão de 34, em que a referida segunda seqüência de polinucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 49 e 50.

37. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 34, em que o referido primeiro polinucleotídeo codifica uma seqüência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 37, 38, 39 e 40.

38. Vetor de expressão, de acordo com a reivindicação 27, em que a referida primeira seqüência de polinucleotídeo codifica uma celulase, a qual naturalmente não tem um CBD.

39. Célula hospedeira compreendendo um vetor de expressão conforme definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38.

40. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 39, a qual é de origem fúngica.

41. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 40, a qual pertence ao fungo filamentosos.

42. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 40 ou 41, a qual pertence ao gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

43. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 42, a qual é *Trichoderma reesei*.

44. Processo para a produção de uma proteína de fusão de celulase, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26, compreendendo os passos de cultivar a célula hospedeira de qualquer uma das reivindicações 40 a 43 e a recuperação da proteína do meio de cultura.

5 45. Preparação de enzima, compreendendo uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26.

46. Processo para desbotamento, o qual compreende o passo de adicionar uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou a preparação da reivindicação 45 a  
10 peças de vestuário ou tecido contendo algodão.

47. Processo, de acordo com a reivindicação 46, em que o tecido ou peças de vestuário é sarja de Nimes.

48. Processo para bioacabamento, o qual compreende o passo de adicionar uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou o preparo da reivindicação 45 para  
15 materiais têxteis como tecidos ou peças de vestuário ou fios.

49. Processo, de acordo com a reivindicação 48, em que os materiais têxteis são produzidos a partir de celulose natural contendo fibras ou  
20 fibras contendo celulose domésticas ou são misturas destes.

50. Processo, de acordo com a reivindicação 48, em que os materiais têxteis são misturas de fibras sintéticas e de fibras contendo celulose.

51. Composição detergente compreendendo uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a  
25 26 ou a preparação de enzima da reivindicação 45 e adjuvantes, tais como agentes ativos de superfície, tensoativos, agentes alvejantes ou abrasivos.

52. Método de tratamento de fibra celulósica, contendo material têxtil, em que o referido método compreende o contato do referido material  
têxtil com a composição detergente da reivindicação 51.

30 53. Método para tratar fibra ou polpa derivada de madeiram i qual compreende o passo de adicionar uma proteína de fusão de celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou o preparo

da reivindicação 45 para polpa química ou mecânica derivada de madeira ou fibra secundária.

54. Método para melhorar a qualidade de ração animal, o qual compreende o tratamento do material vegetal com uma proteína de fusão de  
5 celulase conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou o preparo da reivindicação 45.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROTEÍNA DE FUSÃO DE CELULASE, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DETERGENTE CONTENDO A MESMA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, PROCESSOS PARA DESBOTAMENTO E PARA BIOACABAMENTO E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE FIBRA CELULÓSICA CONTENDO MATERIAL TÊXTIL, PARA TRATAR FIBRA OU POLPA DERIVADA DE MADEIRA E PARA MELHORAR A QUALIDADE DE RAÇÃO ANIMAL".

Campo da Invenção

10 A presente invenção refere-se a novas proteínas de fusão celula-  
lase, preparações e composições contendo essas proteínas de fusão celula-  
se, vetores de expressão, células hospedeiras e métodos para sua prepara-  
ção e usos das celulases, preparações e composições nas indústrias têxtil,  
de detergente e polpa e papel.

15 Antecedentes da invenção

Celulose é um polissacarídeo linear de resíduos de glicose co-  
nectados por ligações  $\beta$ -1,4. Na natureza, celulose é geralmente associada  
com lignina juntamente com hemiceluloses, tais como xilanas e glicomana-  
nas. Enzimas celulolíticas hidrolisam a celulose e são produzidas por uma  
20 ampla variedade de bactérias e fungos. Celulases são enzimas industrial-  
mente importantes com um valor de mercado anual atual de cerca de 190  
milhões de dólares. Na indústria têxtil, celulases são usadas em acabamento  
de sarja de Nimes para criar uma aparência lavada de pedra segundo a mo-  
da em roupas de sarja de Nimes em um processo de desbotamento, e elas  
25 também são usadas, por exemplo, para limpar flocos e prevenir a formação  
de pílulas na superfície de roupas de algodão. Na indústria de detergentes,  
celulases são usadas para clarificar cores e para prevenir o acinzentamento  
e a formação de bolinhas nas peças de roupa. Celulases são ainda usadas  
pela indústria de alimentos e de produção de ração animal, e elas têm um  
30 ótimo potencial na indústria de polpa e papel, por exemplo, na retirada de  
tinta para liberar tinta das superfícies da fibra e na melhoria da drenagem da  
polpa. O amplo espectro de usos industriais para celulases estabeleceu uma

necessidade de produtos de celulase comerciais contendo diferentes componentes de celulase e funcionando otimamente em diferentes faixas de pH e temperatura.

O uso prático de celulases é dificultado pela natureza das celu-  
5 lases conhecidas, as quais são geralmente misturas de celulases com uma  
variedade de atividades e especificidades de substrato. Por essa razão, es-  
forços têm sido feitos para obter celulases com somente as atividades dese-  
jadas. As propriedades únicas de cada celulase tornam algumas mais ade-  
quadas para certos propósitos do que outras. Enquanto as enzimas diferem  
10 em uma variedade de formas, uma das mais importantes diferenças é o pH  
ótimo. Celulases neutras são mais ativas na faixa de pH 6 - 8 e celulases  
alcalinas na faixa de pH 7,5 - 10, enquanto que celulases ácidas, com o pH  
ótimo em pH 4,5 - 5,5, apresentam níveis de atividade muito baixos em valo-  
res de pH mais altos. Celulases neutras e ácidas são especialmente úteis na  
15 indústria têxtil. No tratamento têxtil, as celulases atacam as cadeias de mo-  
léculas de celulose que formam as fibras de algodão, afetando dessa forma  
as características do tecido.

Na indústria têxtil, aparência de "pedra lavada" ou uma aparên-  
cia abradada tem sido interessante para os produtores de sarja nos anos  
20 recentes. A lavagem de pedra tradicional com pedras de pedra-pomes reduz  
a força do tecido e carrega os aparelhos de lavagem. A tendência tem sido  
em relação a processos de acabamento de sarja de Nimes enzimáticos e  
celulases que foram substituídas ou tem sido usadas juntamente com pedra-  
pomes conferir ao tecido sua aparência "gasta" desejada. O tratamento en-  
25 zimático controlado resulta em menos danos para as peças de vestuário e  
máquinas e elimina a necessidade pelo descarte de pedras.

Celulases aplicadas no tratamento de sarja de Nimes são geral-  
mente divididas em dois grupos principais: celulases ácidas e neutras. Celu-  
lases ácidas tipicamente operam em pH 4,5 - 5,5 e as celulases neutras na  
30 faixa de pH 6 - 8. Celulases ácidas usadas em desbotamento principalmente  
se originam da *Trichoderma reesei* (forma sexual da *Hypocrea jecorina*) e as  
celulases neutras vêm de uma variedade de fungos, incluindo os gêneros de

*Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium* e *Chrysosporium* (Haakana *et al.* 2004). Enzimas *T. reesei* incluem, por exemplo, celulases da família de glicosídeos 5 (endoglucanase II, EGII), família 7 (celobio-hidrolase I, CBHI) e família 12 (endoglucanase III, EGIII; Ward *et al.* 1993) e as celulases neutras, mais comumente endoglucanases, da família 45 e da família 7 (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993).

Celulases compreendem um domínio/núcleo catalítico (CD) expressando atividade da celulase. Além do domínio catalítico, a molécula de celulase pode compreender um ou mais domínios de ligação de celulose (CBDs), também chamados de domínios/módulos de ligação de carboidratos (CBD/CBM), os quais podem estar localizados no termino-N- ou no C- do domínio catalítico. CBDs têm atividade de ligação a carboidrato e eles medeiam a ligação da celulase à celulose cristalina, mas têm pouco ou nenhum efeito na atividade hidrolítica da celulase da enzima em substratos solúveis. Esses dois domínios estão tipicamente conectados através de uma região ligante flexível e altamente glicosilada.

Celulases que atacam primariamente na superfície da fibra são especialmente úteis na lavagem com pedra de sarja de Nimes pintada com corante índigo, uma vez que o corante é localizado na superfície da fibra. Quando usado para tratar tecido de algodão, celulases neutras geralmente requerem um tempo de lavagem mais longo do que as celulases ácidas. Entretanto, celulases neutras têm uma ação menos agressiva no algodão do que celulases ácidas, e não afetam a força do tecido tanto quanto as celulases ácidas. Celulases neutras têm um perfil de pH mais amplo e, dessa forma, o aumento no pH que ocorre durante o desbotamento tem pouco efeito na atividade das enzimas de celulase neutras. Entretanto, uma vez que os tratamentos da celulase também têm efeitos indesejáveis, tais como dano de fibras ou perda de força, um equilíbrio adequado entre os efeitos desejados e indesejáveis tem que ser procurado.

WO97/14804, o qual é aqui incorporado por referência, descreve três novas celulases neutras de origem *Melanocarpus*, as quais são especialmente úteis na indústria têxtil e de detergente. Especificamente, uma en-

doglucanase de 20 KDa (Cel45A), uma endoglucanase de 50 KDa (Cel7A) e uma celobio-hidrolase de 50 KDa (Cel7B) são descritas. Essas celulases aqui designadas como "celulase 20K", "celulase 50K" e "celulase 50K B", respectivamente, são derivadas de *Melanocarpus albomyces* e mostram bons efeitos de lavagem de pedra.

Uma vez que há uma demanda existente, especialmente na indústria têxtil e detergente, para outras celulases melhoradas, foi sugerido que melhorias nas celulases poderiam ser obtidas pela formação de proteínas de fusão. Também na WO97/14804, construtos de proteína de fusão da celulase 20K, celulase 50K e celulase 50K B com, por exemplo, celulase, hemicelulase ou manase de *Trichoderma reesei* ou seus domínios funcionais são geralmente sugeridos. Além disso, para criar novas propriedades para as celulases descritas, fusões das celulases descritas com domínios, tais como o domínio de ligação da celulose (CBD), preferivelmente com seu ligante, são sugeridas. Entretanto, nenhum exemplo específico é dado, nem são descritas as novas propriedades a ele destruradas.

Proteínas de fusão de celulase são adicionalmente conhecidas, por exemplo, a partir de WO96/29397, que descreve endoglucanases formadas por uma fusão entre endoglucanases de *Myceliophthora thermophila*, de *Macrophomina phaseolina* e de *Crinipellis scabella* e o CBD/ligante de *Humicola insolens*. As referidas endoglucanases na sua forma natural não têm um CBD/ligante.

EP 663 950 descreve variantes de celulase, especialmente variantes de celulase de *Humicola insolens* de 43 KDa, em que a celulase pode incluir uma região ligante de outra espécie de microrganismo, por exemplo, para proporcionar propriedades melhoradas, tais como resistência melhorada a tensoativos aniônicos, à oxidação ou aos agentes alvejantes.

Entretanto, há uma necessidade contínua por celulases melhoradas que também são menos danosas à fibra na indústria têxtil e em outros campos, onde celulases tradicionalmente são usadas. Particularmente, há uma necessidade contínua por celulases mais eficientes para melhorar a economia do processo.

A presente invenção almeja atender a essa necessidade.

#### Breve Descrição da Invenção

Um objetivo da presente invenção é fornecer novas proteínas de fusão de celulase com propriedades hidrolíticas melhoradas para uso na indústria têxtil, especialmente na lavagem de pedra de sarja de Nimes, e para uso nas composições detergentes assim como em outros campos. As novas proteínas de fusão de celulase da invenção são ativas em valores de pH neutro e alcalino, elas têm um desempenho de lavagem muito melhorado em aplicações de desbotamento e bioacabamento têxtil e em aplicações detergentes, e elas ainda não comprometem a força dos tecidos. Com a eficiência melhorada das proteínas de fusão da celulase, o processo de produção das enzimas é significativamente mais econômico. Vantagens adicionais também são alcançadas em termos de logística e na estocagem dos produtos de enzima, quando quantidades menores de produto de enzima são necessárias.

Um outro objetivo da presente invenção é fornecer polinucleotídeos que codificam as novas proteínas de fusão de celulase das presentes invenções.

Um outro objetivo da presente invenção é fornecer novos plasmídeos ou vetores de expressão contendo tais polinucleotídeos, úteis para a produção de novas proteínas de fusão de celulase da presente invenção, e novos hospedeiros transformados com os respectivos plasmídeos de expressão.

Um outro objetivo da presente invenção é fornecer preparações enzimáticas, as quais contêm uma ou mais novas proteínas de fusão de celulase com propriedades hidrolíticas melhoradas.

Ainda um outro objetivo da presente invenção é fornecer métodos de uso de preparações enzimáticas e as proteínas de fusão de celulase para acabamento de tecidos, especialmente para o desbotamento de sarja de Nimes.

Ainda um outro objetivo da presente invenção é fornecer meios para o uso de preparações enzimáticas da invenção em composições detergentes.

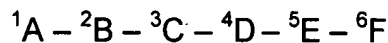
A presente invenção se refere a uma nova proteína de fusão de celulase compreendendo:

A. uma primeira sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e

5 B. uma segunda sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação à celulose (CBD) derivado de outra espécie,

em que uma região de junção foi introduzida entre a referida primeira sequência de aminoácidos e a referida segunda sequência de aminoácidos, por meio da qual uma proteína de fusão estável é obtida.

10 Preferivelmente, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

${}^1A$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^1A$  é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

${}^2B$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente  ${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

${}^3C$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente  ${}^3C$  é Ile;

20  ${}^4D$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^4D$  é Gly ou Pro;

${}^5E$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente  ${}^5E$  é Ser; e

25  ${}^6F$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente  ${}^6F$  é Ser ou está ausente; em que  ${}^1A$  está ligado na sequência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e  ${}^6F$  está ligado na sequência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

A presente invenção ainda se refere a um vetor de expressão compreendendo uma primeira sequência de polinucleotídeo que codifica  
30 uma primeira sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e uma segunda sequência de

polinucleotídeos que codifica uma segunda sequência de aminoácidos op-  
cionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação à celu-  
lose (CBD) derivado de outras espécies, e um polinucleotídeo que codifica  
5 uma região de junção que conecta as referidas primeira e segunda sequên-  
cia de polinucleotídeo, as referidas sequências de polinucleotídeo codifican-  
do as respectivas sequências de aminoácidos das proteínas de fusão de  
celulase da invenção.

A presente invenção ainda se refere a novos hospedeiros trans-  
formados com os vetores da invenção, especialmente hospedeiros que são  
10 capazes de um alto nível de expressão da proteína de fusão de celulase da  
invenção.

A presente invenção se refere ainda a uma preparação enzimá-  
tica, a qual contém uma ou mais proteínas de fusão de celulase da invenção.

A presente invenção se refere ainda a um método para o uso  
15 das preparações enzimáticas da invenção para o acabamento de tecidos,  
especialmente para o desbotamento de sarja de Nimes.

A presente invenção se refere ainda ao uso das preparações  
enzimáticas da invenção em composições de detergente.

#### Desenhos

20 A figura 1 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1480.

A figura 2 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK492.

A figura 3 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK424.

A figura 4 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1237.

A figura 5 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1241.

25 A figura 6 é o mapa esquemático do plasmídeo p3SR2.

A figura 7 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1649.

A figura 8 é o mapa esquemático do plasmídeo pALK1694.

Figura 9A. O cassete de expressão usado na transformação de  
protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão  
30 20K+CBD. O gene 20K+CBD estava sob o controle do promotor *cbh1*  
(*cel7A*) (*cbh1 prom*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso  
da sequência terminadora *cbh1* (*termo*). O gene *amdS* (*amdS*) e a região

flanqueadora *cbh1* 3' (flanqueadora *cbh1* 3') foram incluídos. Figura 9B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) é fundida com o peptídeo ligante CBHI de *Trichoderma reesei* (*cel7A*) seguido pelo domínio de ligação à celulose (CBD) em plasmídeos pALK1434 e pALK1435. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Figura 10A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 20K+CBD. O gene 20K+CBD estava sob o controle do promotor *cbh1* (*cel7A*) (*cbh1 prom*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso da sequência terminadora *cbh1* (*termo*). O gene *amdS* (*amdS*) e a região flanqueadora *cbh1* 3' (flanqueadora *cbh1* 3') foram incluídos. Figura 10B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) é fundida com o peptídeo ligante CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido pelo domínio de ligação à celulose (CBD) em plasmídeos pALK1768, pALK1769, pALK1770 e pALK1775. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Figura 11A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 20K+CBD<sub>mut</sub>. O gene 20K+CBD<sub>mut</sub> estava sob o controle do promotor *cbh1* (*cel7A*) (*cbh1 prom*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso da sequência terminadora *cbh1* (*termo*). O gene *amdS* foi incluído como o marcador de transformação. Figura 11B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A) é fundida com o peptídeo ligante CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido pelo domínio de ligação à celulose (CBD). As substituições de aminoácidos na região CBD dos cassetes de expressão pALK1877 - pALK1880 também estão apresentadas. Os aminoácidos contidos na região

ligante estão sublinhados, e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido e os resíduos de tirosina ou suas substituições na região CBD estão indicados por números sobrescritos.

Figura 12A. Sequência de aminoácidos do peptídeo de ligação interdomínio da CBHI de *T. reesei* (Cel7A). Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados.  $\Delta$ G-444 e  $\Delta$ G-460 representam a anulação do ligante dos resíduos 434 - 444 e 434 - 460, respectivamente. Figura 12B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína de *Melanocarpus albomyces* 20K (Cel45A) está fundida com o peptídeo ligante cortado da CBHI de *Trichoderma reesei* (Cel7A) seguido pelo domínio de ligação à celulose intacto ou modificado (CBD) nos cassetes de expressão pALK1893, pALK1896, pALK1899 e pALK1952. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada por itálico. O primeiro aminoácido e os resíduos de tirosina ou suas substituições na região CBD estão indicados por números sobrescritos.

Figura 13A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 50K+CBD. O gene 50K+CBD está sob o controle do promotor *cbh1* (*cbh1 prom*) de *T. reesei* e a terminação da transcrição é assegurada com a adição do terminador *cbh1* (termo). O gene *amdS* (*amdS*) e a região flanqueadora *cbh1* 3' (*cbh1* 3') são incluídas. Figura 13B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção da 50K de *M. albomyces* ligado ao ligante CBHI + CBD de *T. reesei*. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

Figura 14A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão 50KB+CBD. O gene 50KB+CBD está sob o controle do promotor *cbh1* (*cbh1 prom*) de *T. reesei* e a terminação da transcrição é assegurada com a adição do terminador *cbh1* (termo). O gene *amdS* (*amdS*) e a região flanqueadora *cbh1* 3' (*cbh1* 3') são incluídas. Figura 14B. Sequência de aminoácidos de um

ponto de junção da 50KB de *M. albomyces* ligado ao ligante CBHI + CBD de *T. reesei*. Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a sequência de aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

5                    Figura 15A. O cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *Trichoderma reesei* para produzir as proteínas de fusão CBHI + CBD recombinantes de *Thermoascus aurantiacus*. O gene CBHI+CBD estava sob o controle do promotor *cbh1* (*cbh1 prom*) (*cel7A*) e a terminação da transcrição foi assegurada pelo uso da sequência terminadora (termo). O  
10 gene *amdS* foi incluído como um marcador de transformação. Figura 15B. Sequência de aminoácidos de um ponto de junção no qual a proteína CBHI de *Thermoascus aurantiacus* é fundida com o peptídeo ligante da CBHI de *Trichoderma reesei* seguido pelo domínio de ligação à celulose (CBD). Os aminoácidos contidos na região ligante estão sublinhados, e a sequência de  
15 aminoácidos da região CBD está marcada em itálico. O primeiro aminoácido na região CBD é indicado por números sobrescritos.

A figura 16. O desempenho das cepas RF5977 e RF6090 expressando proteínas de fusão da invenção em comparação com uma preparação comercial 20K no tratamento de sarja de Nimes. O aumento da clari-  
20 dade como uma função da dosagem enzimática em condições de lavagem está descrito nos Exemplos 8 e 9.

A figura 17. Efeito das proteínas de fusão CBD + 20k e as correspondentes preparações enzimáticas comerciais na força do tecido de sarja de Nimes. Figura 17A. Força de rasgo (N), deformação. Figura 17B. Força  
25 de rasgo (N), tecido.

A figura 18 mostra o efeito de remoção de bolinhas da proteína de fusão CBD + 20k.

A figura 19 ilustra o desempenho da proteína de fusão 20K+CBD na aplicação de detergente. A figura mostra a diferença de parelhamento de  
30 cor entre o artigo antiacinzamento 224 lavado com ou sem a enzima, e o artigo original (não-lavado); A. a 40°C e B. a 60°C.

A figura 20 ilustra o desempenho da proteína de fusão 20K+CBD

na aplicação de detergente. A figura mostra a diferença de parelhamento de cor entre o artigo antiacinzentamento 224 lavado com enzima e sem enzima; A. a 40°C e B. a 60°C.

#### Descrição Detalhada da Invenção

5                   A presente invenção é baseada em esforços para melhorar mais celulasas neutras, particularmente aquelas descritas em WO97/14804, objetivando a redução da perda de força no tecido no tratamento enzimático. Em algumas aplicações, a celulase 20K mostrou propriedades indesejáveis em relação à força da fibra, possivelmente devido ao pequeno tamanho. A hipótese simples foi a de que um aumento no tamanho da enzima poderia reduzir a capacidade da enzima de penetrar nas fibras, enfraquecendo dessa forma as fibras para uma extensão menor, isto é, a enzima poderia ser menos agressiva. Para fazer isso, a tentativa de proteína de fusão sugerida em WO97/14804 foi usada, e construtos de fusão contendo um núcleo de celulase neutra de uma espécie *Melanocarpus* e uma cauda consistindo em um ligante/CBD de uma celobio-hidrolase ácida I de *T. reesei* foram projetados. Surpreendentemente, entretanto, ao contrário das sugestões da técnica anterior, construtos de proteína de fusão completamente estáveis não puderam ser obtidos, nas os parceiros de fusão separados um do outro nas condições de cultivo. Isso foi presumivelmente devido à presença de protease(s).

15                   Para produzir as proteínas de fusão estáveis, uma tentativa foi projetar novos construtos de junção sem ter aminoácidos hidrofóbicos adjacentes (por exemplo, V, I, L, F e W) para prevenir a clivagem por aspartiloproteases. Entretanto, embora os construtos produzissem proteínas de fusão, ocasionalmente foi observada alguma degradação.

25                   Baseando-se no alinhamento das celulasas neutras contendo naturalmente uma cauda de ligante/CBD, outros construtos foram produzidos e finalmente esses construtos provaram ser mais estáveis e mais úteis para testagem adicional. Além disso, construtos de fusão foram projetados os quais carregaram mutações no CBD resultando em afinidade ou adsorção reduzida ou mínima para a celulose (Linder *et al.*, 1995).

30                   Os novos construtos produziram propriedades de força melhora-

das, como foi o objetivo. Surpreendentemente, as proteínas de fusão de celulase estáveis apresentaram adicionalmente melhoria não-esperada no desempenho de lavagem, e foram tão altas quanto mesmo seis vezes tão eficientes quanto suas celulases "de origem". Entretanto, os rendimentos de produção foram mantidos acerca do mesmo nível. Isso significa que somente um sexto da quantidade de atividade de celulase presentemente necessária é suficiente para alcançar o mesmo desempenho de lavagem da celulase da técnica anterior. Isso produz economias consideráveis no passo de produção, e também na logística e estocagem, diminuindo dessa forma a carga ambiental. Também os efeitos indesejáveis das preparações de celulase são reduzidos, causando dessa forma economias adicionais para os usuários finais do produto enzimático. Considerando que cerca de 2 bilhões de pares de calças jeans são produzidos anualmente, e a maior parte deles é finalizada com celulase, a vantagem é altamente significativa.

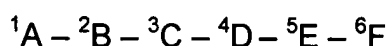
Concordantemente, a presente invenção fornece uma nova proteína de fusão de celulase, compreendendo:

A. uma primeira sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e

B. uma segunda sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação à celulose (CBD) derivado de outra espécie,

em que uma região de junção foi introduzida entre a referida primeira sequência de aminoácidos e a referida segunda sequência de aminoácidos, por meio da qual uma proteína de fusão estável é obtida.

Em uma modalidade preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

${}^1A$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^1A$  é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

${}^2B$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente  ${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

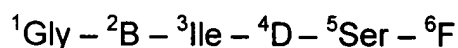
<sup>3</sup>C é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente <sup>3</sup>C é Ile;

<sup>4</sup>D é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente <sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

5 <sup>5</sup>E é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente <sup>5</sup>E é Ser; e

<sup>6</sup>F é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente <sup>6</sup>F é Ser ou está ausente; em que <sup>1</sup>A está ligado na sequência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e <sup>6</sup>F está ligado na sequência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

Em uma modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

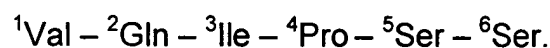
15 <sup>2</sup>B é Pro, Gln, ou Glu;

<sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

<sup>5</sup>E é Ser; e

<sup>6</sup>F é <sup>6</sup>F é Ser ou está ausente.

Em outra modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



Em outra modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



25 Em outra modalidade especialmente preferida da invenção, a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



Em uma modalidade preferida da invenção, a primeira sequência de aminoácidos é de uma celulase neutra e a segunda sequência de aminoácidos é de uma celulase ácida.

Em outra modalidade preferida da invenção, a primeira sequência de aminoácidos é de uma celulase da família 45 (Cel 45) e a segunda

sequência de aminoácidos é da celulase da família 7 (Cel 7).

Conforme usado no presente contexto, a expressão "núcleo de celulase" ou "núcleo" significa o domínio/núcleo catalítico (CD) de uma enzima expressando atividade da celulase. Tal domínio catalítico pode estar na sua forma de ocorrência natural (isto é, intacto) ou, preferivelmente, estar modificado conforme definido abaixo. As expressões "derivado" e variante funcional denotam polipeptídeos expressando a mesma atividade da celulase, mas incluindo modificações conforme definido abaixo.

No presente contexto, códigos de aminoácidos de uma letra e códigos de aminoácido de três letras convencionais são usados. Consequentemente, A e Ala denotam alanina, R e Arg denotam arginina, N e Asn denotam asparagina, D e Asp denotam ácido aspártico, Cys e C denotam cisteína, E e Glu denotam ácido glutâmico, Q e Gln denotam glutamina, G e Gly denotam glicina, H e His denotam histidina, I e Ile denotam isoleucina, L e Leu denotam leucina, K e Lys denotam lisina, Me e Met denotam metionina, F e Phe denotam fenilalanina, P e Pro denotam prolina, S e Ser denotam serina, T e Thr denotam treonina, W e Trp denotam triptofano, Y e Tyr denotam tirosina e V e Val denotam valina. Além de L-aminoácidos de ocorrência natural, D-aminoácidos também poderiam ser usados.

Nas proteínas de fusão de celulase da invenção, a celulase neutra é preferivelmente de origem fúngica. A celulase neutra pode ser derivada do gênero de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, *Talaromyces*, ou *Chaetomium*. São especialmente preferidas as *Melanocarpus sp.*, com *Melanocarpus albomyces* sendo especialmente preferida. A celulase ácida usada nas proteínas de fusão da celulase da invenção foram originadas de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, especialmente de *Trichoderma reesei*.

Em uma modalidade especificamente preferida da invenção, a primeira sequência de aminoácidos é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 ou um derivado do mesmo, e a segunda sequência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobio-hidrolase I de *Tricho-*

*derma reesei* da SEQ ID NO: 4 ou um derivado do mesmo.

Em uma modalidade preferida da invenção, as proteínas de fusão de celulase contêm modificações no núcleo da celulase e/ou no ligante e/ou CBD. Conforme usado no presente contexto, a expressão "modificado" se refere a mutações, tais como inserção ou substituição de um ou mais aminoácidos, ou outras modificações, tais como glicosilações. Exemplos de tais mutações incluem a substituição de resíduos de tirosina conservados nas posições 31 (correspondendo à tirosina Y492 do polipeptídeo maduro) e/ou 32 (correspondendo à tirosina Y493 do polipeptídeo maduro) com um aminoácido alifático, preferivelmente com alanina, e/ou com um aminoácido aromático, tal como triptofano, de CBD ou CBHI de *Trichoderma reesei* conforme descrito por Linder *et al.* 1995. Outros exemplos de tais mutações incluem mutações interligantes de CBHO de *Trichoderma reesei* conforme descrito por Srisodsuk *et al.*, 1993, tais como anulações de aminoácidos da posição 434 até a 444 e da posição 434 até a 460 da sequência de CBHI de *Trichoderma* maduro. Outros exemplos de tais mutações incluem a anulação da Ala na posição 207, a anulação da Va na posição 208, a substituição da Phe209Trp e a inserção de Pro depois da posição 206 na sequência de 20K celulase de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2.

As proteínas de fusão da celulase da invenção são estáveis. No contexto da presente invenção, a expressão "proteína de fusão de celulase estável" significa que pelo menos 20%, preferivelmente pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente 90 - 100% da proteína de fusão de celulase produzida contém uma região de junção não-clivada entre as sequências de aminoácidos durante a fermentação. Isso significa que 20% - 100%, preferivelmente 40% - 100%, mais preferivelmente 70% - 100% da celulase produzida tem a primeira e a segunda sequência de aminoácidos unidas por fusão. A expressão "proteína de fusão de celulase estável" significa adicionalmente que o preparo da proteína de fusão de celulase pode ser estável como tal ou foi estabilizado, por exemplo, por tratamento com calor ou pelo ajuste do pH ou pela adição de estabilizantes ou agentes que reduzem a atividade da protease ou pela separação da proteína

de fusão da cultura. O tratamento com calor no presente contexto significa um tratamento em uma temperatura a qual permita que a proteína de fusão na preparação seja mantida adequadamente estável. O tratamento com calor pode ser, por exemplo, um tratamento no pH 6,0 a 65°C por 60 a 70 minutos.

No presente contexto, a expressão "proteína de fusão intacta" significa que a junção entre a primeira e a segunda sequência de aminoácidos na proteína de fusão da invenção permanece não quebrada, embora possa ou não aparecer degradação terminal nas referidas sequências.

Em uma modalidade preferida da proteína de fusão da celulase da invenção, a primeira sequência de aminoácido é uma sequência 20K de *Melanocarpus albomyces* com SEQ ID NO: 2 ou uma variante funcional sua. Em outra modalidade preferida da primeira sequência de aminoácido é a sequência 50K de *Melanocarpus albomyces* com a SEQ ID NO: 6 ou uma variante funcional sua. Em outra modalidade preferida da primeira sequência de aminoácidos é a sequência 50KB de *Melanocarpus albomyces* com a SEQ ID NO: 8 ou uma variante funcional sua. Em outra modalidade preferida da primeira sequência de aminoácidos é a sequência da CBHI de *Thermascus aurantiacus* com SEQ ID NO: 10 ou uma variante funcional sua. Em ainda uma modalidade preferida da proteína de fusão de celulase da invenção, a segunda sequência de aminoácidos é o ligante e a sequência de domínio de ligação da celulase com SEQ ID NO: 4 da celobio-hidrolase I de *Trichoderma reesei* ou uma variante funcional sua.

Dessa forma, uma modalidade altamente preferida da proteína de fusão da celulase da invenção, a primeira sequência de aminoácidos do núcleo de celulase é selecionada da SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 43, especialmente SEQ ID. NO: 39, e a segunda sequência de aminoácidos de uma sequência ligante e/ou CBD é selecionada de SEQ ID. NO: 44, 45, 46, 47, 48, 49 e 50. em uma modalidade especial da invenção, a primeira sequência de aminoácidos do núcleo de celulase é a SEQ ID NO: 39 e a segunda sequência de aminoácidos de uma sequência ligante e/ou CBD é a SEQ ID NO: 47, 49 ou 50.

A presente invenção ainda se refere a um vetor de expressão compreendendo uma primeira sequência de polinucleotídeo codificando uma primeira sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e uma segunda sequência de polinucleotídeo codificando uma segunda sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação à celulose (CBD) derivado de outra espécie, e um polinucleotídeo codificando uma região de junção específica conectando as referidas primeira e segunda sequências de polinucleotídeo, as referidas sequências de polinucleotídeo codificando as respectivas sequências de aminoácidos conforme especificamente definido acima.

A presente invenção se refere ainda a preparações de celulase contendo uma ou mais proteínas de fusão de celulase da invenção, sozinhas ou juntas com enzimas adicionais e aditivos de acordo com a aplicação especial em questão.

A presente invenção se refere ainda aos usos de e métodos para o uso das preparações de proteína de fusão de celulase da invenção para os propósitos especificamente descritos abaixo.

As preparações de proteína de fusão de celulase da invenção são especialmente úteis na indústria têxtil e detergente. Essas celulasas apresentam um efeito de abrasão altamente melhorado e visível e um aumento da claridade mensurável. Eles apresentam um manchamento de fundo aceitável e bom, assim como um contraste focado em desbotamento. Eles são úteis na indústria têxtil para o bioacabamento de tecidos ou peças de vestuário, por exemplo, remoção de bolinhas, desfloculação, clarificação de cor, redução de aspereza, criação de diferentes acabamentos (por exemplo, um efeito de "pele de pêssego", "usado", "lavado em areia" ou "aparência antiga") e para o bioacabamento de fio, por exemplo, redução do excesso de pelos e melhoria da maciez. Ter tais boas propriedades de remoção de bolinhas é muito incomum para celulasas neutras, uma vez que as enzimas usadas nas aplicações de bioacabamento industrial são tipicamente celulasas ácidas. Celulase neutra com excelentes propriedades de remoção de boli-

nhas como a proteína de fusão CBD + 20k capacita o tratamento de bioacabamento simultaneamente durante a tintura, levando a economias consideráveis. Também a firmeza de cor é geralmente melhor em condições neutras do que em ácidas.

5 Usos adicionais incluem o uso em composições detergentes para melhorar as propriedades de cuidado de tecido por antiformação de bolinhas, antiacinzentamento, clarificação de cor e amaciamento, e para melhorar o efeito de limpeza têxtil, por exemplo, remoção de manchas.

10 Conforme utilizado no presente contexto, a expressão "desbotamento" de tecido ou peça de vestuário significa o uso de enzimas no lugar de, ou além de, pedra-pomes para o tratamento de tecido ou vestuário, especialmente sarja de Nimes.

15 Conforme utilizado no presente contexto, a expressão "bioacabamento" se refere ao uso de enzimas em uma hidrólise controlada de fibras celulósicas para modificar a superfície do fio ou tecido de uma forma que previna permanentemente a formação de bolinhas, melhore o manuseio de tecido como maciez e lisura, limpe a estrutura da superfície pela redução da flocosidade, o que resulta na clarificação de cores, melhora a capacidade de prender do tecido, melhora a capacidade de absorção de umidade, o que  
20 pode melhorar também a capacidade de coloração.

Conforme utilizado no presente contexto, a expressão "backstaining" se refere à tendência de o corante liberado redepositar na superfície das fibras do tecido.

25 Conforme usado no presente contexto, a expressão "detergente" se refere a um agente de limpeza que pode conter agentes ativos de superfície (tensoativos aniônico, não-iônico, catiônico e anfótero), abrasivos e outros ingredientes opcionais, tais como agentes anti-redeposição e de suspensão de manchas, clarificadores óticos, agentes alvejantes, corantes e pigmentos e hidrolases. Uma listagem adequada dos conteúdos de deter-  
30 gentes é dada na Patente U.S. Nº 5.433.750, uma lista adequada de tensoativos é dada na Patente U.S. Nº 3.664.961.

Por uma sequência de aminoácido que é um "equivalente" ou

um "derivado" de uma sequência de aminoácido específica se entende uma sequência de aminoácido que não é idêntica à sequência de aminoácido específica, mas antes contém pelo menos algumas alterações de aminoácidos (anulações, substituições, inversões, inserções, etc.) que não necessariamente afetam a atividade biológica da proteína em comparação com uma  
5 atividade similar da sequência de aminoácido específica, quando usada para uma dada aplicação.

A atividade biológica de uma celulase é a sua atividade catalítica, e/ou sua capacidade de se ligar ao material celulósico.

10 Um vetor de expressão é um plasmídeo de clonagem ou um vetor capaz de expressar DNA que codifica as proteínas de fusão de celulase da invenção após a transformação em um hospedeiro desejado. Quando um hospedeiro fúngico é usado, o gene de interesse é preferivelmente fornecido a um hospedeiro fúngico como parte de um veículo de expressão ou clona-  
15 gem que se integra no cromossomo fúngico, ou permite que o gene de interesse se integre no cromossomo hospedeiro, ou como um plasmídeo que se replica autonomicamente. Sequências que são parte do veículo de clonagem ou do veículo de expressão também podem estar integradas com o referido DNA durante o processo de integração. Além disso, no fungo o vetor de ex-  
20 pressão ou suas partes podem ser alvejadas em locais predeterminados.

O DNA que codifica as proteínas de fusão da invenção é também preferivelmente colocado sob o controle de (isto é, operativamente ligado a) certas sequências de controle, tais como sequências promotoras fornecidas pelo vetor (a qual se integra com o gene de interesse). Alternativa-  
25 mente, as sequências de controle podem ser aquelas no sítio de inserção.

As sequências de controle de expressão de um vetor de expressão irá variar dependendo se o vetor é projetado para expressar certo gene em um hospedeiro procariótico ou em um eucariótico (por exemplo, um vetor para lançamento pode fornecer um gene para seleção em hospedeiros bac-  
30 terianos). Sequências de controle de expressão podem conter elementos regulatórios transcricionais tais como promotores, elementos intensificadores e sequências de terminação transcricionais, e/ou elementos regulatórios tra-

ducionais, tais como de iniciação traducional e sítios de terminação.

Uma molécula de polinucleotídeo, tal como DNA, é dita como sendo "capaz de expressar" um polipeptídeo se ele contiver sequências de controle de expressão as quais contêm informação regulatória transcricional e tais sequências são "operavelmente ligadas" à sequência de nucleotídeo a  
5 qual codifica o polipeptídeo.

Uma ligação operável é uma ligação na qual a sequência é conectada a uma sequência (ou sequências) regulatória de tal forma a colocar a expressão da sequência sob a influência ou controle da sequência regula-  
10 tória. Duas sequências de DNA (tal como uma sequência da região promotora ligada à extremidade 5' da sequência codificadora de proteína) são ditas como sendo operavelmente ligadas em função dos resultados do promotor na transcrição.

Os vetores da invenção podem ainda compreender outros elementos regulatórios operativamente ligados, tais como sequências intensifi-  
15 cadoras.

Em uma modalidade preferida, transformantes geneticamente estáveis são construídos por meio dos quais o DNA que codifica as proteínas de fusão da celulase da invenção está integrado no cromossomo do  
20 hospedeiro pela transformação com um vetor, o qual abriga sequências que promovem a integração do referido vetor no cromossomo.

Células que têm DNA estavelmente integrado que codifica as proteínas de fusão de celulase da invenção nos seus cromossomos são selecionadas também pela introdução de um ou mais marcadores, homólogos ou heterólogos, os quais permitem a seleção de células hospedeiras as  
25 quais contêm o vetor de expressão no cromossomo, por exemplo, o marcador ao proporcionar resistência a biocida, por exemplo, resistência a antibióticos, ou metais pesados, tais como cobre, ou marcadores complementando uma mutação auxotrófica no cromossomo hospedeiro, e semelhantes. O  
30 gene do marcador selecionável pode ou estar diretamente ligado às sequências de gene de DNA a serem expressas ou introduzido na mesma célula por cotransformação.

Uma vez que o vetor ou sequência de DNA da invenção contendo o(s) construto(s) é preparada para expressão, o(s) construto(s) de DNA é introduzido em uma célula hospedeira apropriada por qualquer uma de uma variedade de formas adequadas, incluindo a transformação conforme é conhecido na técnica. Depois da introdução do vetor, as células receptoras crescem em um meio seletivo, o qual seleciona para o crescimento de células transformadas.

Sistemas hospedeiros de expressão e produção adequados são, por exemplo, o sistema de produção desenvolvido para o hospedeiro de fungo *Trichoderma* (EP 244 234), ou um sistema de produção de *Aspergillus*, tal como *A. oryzae* ou *A. niger* (WO 9708325 e WO 9533386, US 5.843.745, US 5.770.418), ou a produção de um sistema desenvolvido para *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Malardier et al., 1989). Sistemas de produção adequados desenvolvidos para bactéria são um sistema de produção desenvolvido para *Bacillus*, por exemplo *B. subtilis* ou para *E. coli*, ou para o actinomiceto *Streptomyces*. Sistemas de produção adequados desenvolvidos para leveduras são sistemas desenvolvidos para *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces* ou *Pichia pastoris*. Sistemas de produção em alguns outros micróbios ou em células de mamíferos ou em plantas também são possíveis.

A expressão da(s) sequência(s) de gene clonado resulta na produção da proteína desejada, ou na produção de um fragmento dessa proteína. Essa expressão pode ocorrer de uma forma contínua nas células transformadas, ou de uma forma controlada.

Fragmentos são entendidos como sendo partes das moléculas de ácido nucléico longas o suficiente para codificar a proteína descrita ou um fragmento biologicamente ativo seu. O termo "derivado" significa nesse contexto que as sequências de nucleotídeos dessas moléculas diferem das sequências das moléculas de ácido nucléico descritas acima em uma ou mais posições e são altamente homólogas à referida sequência. Entende-se que homologia se refere a uma identidade de sequência de pelo menos 40%, particularmente a uma identidade de pelo menos 60%, preferivelmente mais de 80% e ainda mais preferivelmente de mais de 90%. Os desvios das mo-

léculas de ácido nucléico descritos acima podem ser o resultado da anulação, substituição, inserção, adição ou combinação. Homologia, além disso, significa que as respectivas sequências de nucleotídeo ou proteínas codificadas são funcional e/ou estruturalmente equivalentes.

5                   Conforme usado no presente contexto, as expressões "preparação de enzima" e "preparação de celulase" se referem a qualquer produto enzimático, o qual contém pelo menos uma proteína de fusão de celulase. Consequentemente, tal preparação de enzima pode ser um meio de cultura gasto ou filtrado contendo uma ou mais proteínas de fusão de celulase ou  
10                   uma ou mais proteínas de fusão de celulase e outras enzimas, uma proteína de fusão de celulase isolada ou uma mistura de uma ou mais proteínas de fusão de celulase ou uma mistura de uma ou mais proteínas de fusão de celulase e uma ou mais outras enzimas. Além da atividade da proteína de fusão de celulase, tal preparação pode conter aditivos, tais como estabilizantes, tampões, conservantes, tensoativos e/ou componentes de meio de cul-  
15                   tura. Aditivos preferidos são tais, os quais são comumente usados nas preparações enzimáticas tencionadas para o pedido, onde a preparação enzimática é usada. A preparação enzimática pode estar na forma de líquido, pó ou granulado.

20                   Por "meio de cultura gasto" é aqui significado o meio de cultura do hospedeiro compreendendo as enzimas produzidas. Preferivelmente, as células hospedeiras são separadas do referido meio depois da produção.

                    A preparação enzimática pode compreender uma ou mais proteínas de fusão de celulase da presente invenção ou outras enzimas de celu-  
25                   lase juntamente com uma ou mais proteínas de fusão de celulase da presente invenção. Por exemplo, proteínas de fusão de celulase com diferentes propriedades podem ser combinadas para tornar a preparação enzimática mais útil para diferentes condições.

                    Para obter as preparações enzimáticas da invenção, os hospedeiros com as propriedades desejadas (isto é, hospedeiros capazes de expressar quantidades economicamente praticáveis das proteínas de fusão de  
30                   celulase da invenção) são cultivados sob condições adequadas, as enzimas

desejadas são secretadas dos hospedeiros no meio de cultura e a preparação enzimática é recuperada do referido meio de cultura por métodos conhecidos na técnica.

5 A preparação enzimática pode compreender, além da proteína de fusão de celulase, uma ou mais outras enzimas, as quais podem ser, por exemplo, amilases, lacases e/ou peroxidases. Alternativamente, antes, durante ou depois do tratamento com a proteína de fusão de celulase da presente invenção, outro tratamento enzimático pode ser executado. O tratamento enzimático pode compreender, por exemplo, um ou mais tratamentos  
10 com amilase, um ou mais tratamentos com celulase e/ou um ou mais tratamentos com peroxidase e/ou lacase. Quais outras enzimas são incluídas na preparação enzimática ou são usadas no tratamento enzimático depende da aplicação.

15 A preparação enzimática pode ser o meio de cultura com ou sem as células hospedeiras naturais ou transformadas, ou é recuperada do mesmo pela aplicação de métodos bem-conhecidos na técnica. Entretanto, devido às proteínas de fusão de celulase da invenção serem secretadas no meio de cultura e apresentarem atividade nas condições ambiente do líquido celulótico, é uma vantagem da invenção que as preparações enzimáticas da  
20 invenção possam ser utilizadas diretamente do meio de cultura sem purificação adicional. Caso desejado, tais preparações podem ser liofilizadas ou a atividade enzimática, de outra forma, concentrada e/ou estabilizada para estocagem. As preparações enzimáticas da invenção são muito econômicas para suprir e usar porque (1) as enzimas podem ser usadas de uma forma  
25 bruta; o isolamento de uma enzima específica do meio de cultura é desnecessário e (2) devido às enzimas serem secretadas no meio de cultura, somente o meio de cultura precisa ser recuperado para obter a preparação enzimática desejada; não há necessidade de extrair uma enzima dos hospedeiros. Preferivelmente, o hospedeiro para tal produção é *Trichoderma*, e  
30 especialmente *T. reesei*.

As preparações enzimáticas da invenção podem ser fornecidas como um líquido ou como um sólido, por exemplo, uma forma de pó seco ou

granular ou líquida, especialmente de grânulos que não espanam, ou um líquido estabilizado, ou a preparação enzimática pode ser, de outra forma, concentrada ou estabilizada para estocagem ou uso. É previsto que preparações enzimáticas contendo uma ou mais das celulases neutras da invenção possam ser adicionalmente enriquecidas ou tornadas parcial ou completamente deficientes em atividades enzimáticas específicas, de forma a satisfazer os requerimentos de uma utilidade específica em várias aplicações, por exemplo, na indústria têxtil. Uma mistura de atividades enzimáticas secretadas por um hospedeiro e, especialmente, um fungo, pode ser escolhida como sendo vantajosa em uma aplicação industrial particular, por exemplo, desbotamento.

As preparações enzimáticas da invenção podem ser ajustadas para satisfazer os requerimentos de necessidades específicas em várias aplicações na indústria têxtil, de detergente ou de polpa e papel.

Misturas podem ser preparadas com outras macromoléculas que não são necessariamente todas produzidas a partir do mesmo hospedeiro (por exemplo, outras enzimas tais como endoglucanases, proteases, lipases, peroxidases, oxidases ou amilases) ou substâncias químicas que podem aumentar o desempenho, estabilidade ou tamponamento da preparação enzimática desejada. Grânulos que não espanam podem ser revestidos. Preparações enzimáticas líquidas podem ser estabilizadas pela adição de um poliol, tal como propilenoglicol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido lático ou ácido bórico, ou cloreto de sódio, de acordo com métodos estabelecidos.

Formas protegidas das enzimas da invenção podem ser preparadas conforme descrito na EP 238.216.

As preparações enzimáticas da invenção podem conter um tensoativo o qual pode ser aniônico, não-iônico, catiônico, anfotérico ou uma mistura desses tipos, especialmente quando usada como uma composição detergente. Composições detergentes úteis estão descritas, por exemplo, na WO 94/07998, Patente U.S. Nº 5.443.750 e na Patente U.S. Nº 3.664.961.

Caso requerida, uma enzima desejada pode ser ainda purificada de acordo com condições convencionais, tais como extração, precipitação,

cromatografia, cromatografia por afinidade, eletroforese ou semelhantes.

As preparações enzimáticas dessa invenção são especialmente úteis na indústria têxtil, preferivelmente em desbotamento e no bioacabamento ou na indústria detergente. Outras áreas úteis são na indústria de polpa e papel.

Lavagens de pedra têm três passos: desgrude, abrasão e pós-tratamento. O primeiro passo, o processo de desgrude é normalmente o primeiro tratamento úmido do jeans e significa a remoção de amido ou de outros agentes de resistência aplicados usualmente aos fios urdidos para prevenir o dano durante o processo de tecelagem. Alfa-amilases são usadas para remover goma baseada em amido para um processamento úmido melhorado e uniforme. Depois da desgomagem os jeans são normalmente enxaguados com água ou continuados diretamente com o passo de abrasão.

O segundo passo, abrasão, pode ser efetuado com enzimas ou pedra-pomes ou ambas. Em todos os casos, a ação mecânica é necessária para remover o corante, e o tratamento é geralmente executado em máquinas de lavar roupa, como lavadoras de tambor. O termo "abradado" significa aqui a aparência do tecido de sarja de Nimes quando ele foi tratado por enzimas de celulase ou pedras, ou ambos. Como resultado da remoção de corante desigual, existem contrastes entre áreas com corante e áreas a partir das quais corante foi removido. Expressões sinônimas são "aparência de lavado em pedra" ou "aparência gasta". Na lavagem com pedra enzimática, ou desbotamento, a abrasão com pedra-pomes é completa ou parcialmente eliminada e a celulase é adicionada para facilitar a abrasão do corante índigo da superfície da fibra. O tratamento com celulase pode ser feito usando celulasas neutras ou ácidas, ou ambas. Se um tecido não for tratado com celulase ou lavado em pedra, a aparência do tecido é dita como sendo "pesada", uma vez que os contrastes da moda poderiam estar faltando. Quando um efeito mais desbotado é desejado, o alvejamento usando agentes químicos e/ou métodos enzimáticos, tais como tratamento com lacase, pode ser executado.

Abrasão é geralmente seguida pelo terceiro passo, depois do

tratamento, que inclui os passos de lavagem e de enxágue durante os quais detergentes, clarificadores óticos ou amaciantes podem ser usados. Depois do tratamento enzimático, a reação deve ser interrompida para prevenir danos dos materiais tratados, por exemplo, por inativação por temperatura e/ou pH, o último compreendendo um enxágue completo e/ou uma remoção por lavagem do detergente. Isso assegura que a força mecânica da fibra não seja adicionalmente comprometida pela presença continuada da enzima.

Por "sarja de Nimes" se entende, juntamente com essa invenção, tecido de sarja de Nimes, usualmente peças de roupa de sarja de Nimes, particularmente jeans. Vantajosamente, a sarja de Nimes é sarja de Nimes corada com índigo. Sarja de Nimes também pode ser tratada com índigo, com derivados do índigo ou sarja de Nimes corada com índigo juntamente com algum outro corante, por exemplo, sarja de Nimes corada com índigo com fundo de enxofre.

Tratamento com celulase(s) pode substituir completamente o tratamento com pedras-pomes (por exemplo, 1 Kg de enzima comercial vs. 100 Kg de pedras). Entretanto, o tratamento com celulase pode ser combinado com o tratamento com pedra-pomes quando for desejado produzir um acabamento pesadamente abradado. Um efeito de pele de pêssigo no qual uma fina cobertura semelhante a pelos espichada é criada também é conseguido por uma lavagem combinando uma celulase neutra com pedra-pomes. As celulasas dessa invenção são especialmente úteis para proporcionar um visual abradado e para minimizar o manchamento de fundo no desbotamento.

Desbotamento é preferivelmente efetuado em um pH de cerca de 4,5 - 9,5, e mais preferivelmente entre um pH de 6,0 - 8,0. A temperatura da reação pode variar de cerca de 40 - 80°C, preferivelmente entre 50 - 70°C, e mais preferivelmente entre 55 - 65°C, e mais preferivelmente a 60°C. A proporção de líquido (a proporção do volume de líquido por peso de tecido) pode variar de cerca de 2:1 - 30:1, preferivelmente 4:1 - 15:1, e mais preferivelmente de 5:1 - 10:1. A dosagem enzimática pode variar de cerca de 5 - 8000 NCU/g de tecido, preferivelmente de 20 - 3000 NCU/g de tecido e

mais preferivelmente de 30 - 1500 NCU/g de tecido. O tempo de tratamento pode variar entre 15 min - 4 h, mais preferivelmente de 20 min - 90 min e mais preferivelmente de 30 min - 60 min. Deve ser enfatizado que a dosagem enzimática depende em grande parte do tipo de tecido, maquinaria, condições do processo (pH, temperatura, proporção do líquido, tempo de tratamento, carga de sarja de Nimes, escala do processo) e do tipo de preparação enzimática e semelhantes. Caso desejado, pedra-pomes podem ser usadas juntamente com as proteínas celulase de fusão. A dosagem enzimática requerida será, então, significativamente mais baixa. Uma pessoa versada na técnica é capaz de definir dosagens e condições adequadas.

As proteínas de fusão de celulase da invenção são úteis na indústria têxtil para o bioacabamento de tecidos ou peças de roupa, por exemplo, remoção de bolinhas, desfloculação, clarificação de cor, redução da aspereza, criação de diferentes acabamentos (por exemplo, um efeito de "pele de pêssago", "gasto", "lavado em areia" ou "aparência antiga") e o bioacabamento dos fios (por exemplo, redução dos pelos, melhoria da maciez). As proteínas de fusão de celulase dessa invenção podem ser usadas no bioacabamento em ácido e em condições neutras usando basicamente as mesmas condições que no desbotamento.

As proteínas de fusão de celulase dessa invenção são úteis nas composições detergentes para melhorar as propriedades de cuidado de tecido por antiforcação de bolinhas, antiacinzentamento, clarificação de cor e amaciamento, e para melhorar o efeito de limpeza têxtil, por exemplo, remoção de manchas.

O material têxtil que é tratado com as preparações enzimáticas da invenção pode ser produzido de celulose natural contendo fibras ou celulose sintética contendo fibras ou misturas suas. Exemplos de celulósicos naturais são algodão, linho, cânhamo, juta e rami. Exemplos de celulósicos sintéticos são viscose, acetato de celulose, triacetato de celulose, "raion", cupro e liocel. Os celulósicos acima mencionados podem também ser empregados como misturas de fibras sintéticas tais como poliéster, poliamida ou fibras acrílicas. O material têxtil pode ser fio ou tricotado ou trançado ou

formado por qualquer outro meio.

As celulasas da invenção, além de serem especialmente úteis para o tratamento de tecidos, são úteis em geral em qualquer área que requeira a atividade de celulase.

5 Na indústria de polpa e de papel, celulasas neutras podem ser usadas, por exemplo, na retirada de tinta de diferentes papéis reciclados e em papelões com pH neutro ou alcalino, na melhoria da qualidade da fibra ou no aumento da drenagem na produção de papel. Outros exemplos incluem a remoção do espessante da pasta de estampagem e do excesso de  
10 corante depois da estampagem têxtil, e como um tratamento para ração animal. Por exemplo, se a aplicação tencionada for a melhoria da força da polpa mecânica, então as preparações enzimáticas da invenção podem fornecer uma ou mais dessas proteínas de forma a aumentar ou facilitar a capacidade das fibras de celulose de se ligarem juntas. De uma forma similar,  
15 na aplicação do refinamento da polpa, as preparações de proteína de fusão de celulase da invenção podem proporcionar uma ou mais dessas proteínas em um nível que intensifique ou facilite tal expansão. Das proteínas de fusão da invenção especialmente adequadas para aplicações de polpa são aquelas com 50 KB de *Melanocarpus albomyces* ou núcleo de CBHI de *Thermo-*  
20 *ascus aurantiacus*.

As proteínas de fusão de celulase da presente invenção proporcionam vantagens não-esperadas quando usadas na indústria têxtil e especialmente em desbotamento. As proteínas de fusão de celulase da invenção são consideravelmente mais eficientes do que as celulasas da técnica anterior.  
25 No desbotamento dosagens pelo menos duas vezes, usualmente pelo menos três vezes e mesmo seis vezes menores em termos de unidades de atividade de celulase neutra dosadas no peso do tecido puderam ser usadas, sem impedir a força do tecido. Em outras palavras, um desempenho até seis vezes maior é alcançado pelo uso das proteínas de fusão da celulase  
30 da presente invenção. Uma vez que o rendimento da produção das proteínas de fusão da celulase da invenção corresponde àquele da celulase 20K conhecida, a eficiência de produção global é significativamente melhorada.

Isso pode ser proporcionado diretamente para grandes economias nas quantidades de enzimas necessárias: a possibilidade de usar quantidades reduzidas da enzima oferece um valor econômico considerável em termos tanto de produção quanto de uso, incluindo a logística.

5 A invenção é descrita em maiores detalhes nos seguintes exemplos, os quais não são para serem interpretados para estreitar o escopo da invenção, mas somente para esclarecer o uso da invenção.

#### **Exemplo 1. Construção dos vetores de expressão para as proteínas de fusão CBD + 20k**

10 Métodos de biologia molecular padronizados foram usados no isolamento, purificação e tratamentos enzimáticos de DNA (plasmídeos, fragmentos de DNA) em reações em cadeia da polimerase (PCR), em transformações com *E. coli*, etc. Os métodos básicos usados estão descritos nos manuais de biologia molecular padrão, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989)  
15 e Sambrook and Russell (2001).

Construtos de plasmídeos foram projetados para juntar a sequência codificadora de 20K de *Melanocarpus albomyces* (Cel45A, ACNº AJ515703; SEQ ID. NO: 1) com a sequência codificadora do ligante e CBD do CBHI de *Trichoderma reesei* (ACNº AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993; SEQ ID. NO: 3). De modo geral, seis junções diferentes foram projetadas  
20 conforme descrito na Tabela 1.

Para os construtos Nº 1 e Nº 2 estabelecidos na Tabela 1, um único sítio NruI foi introduzido na extremidade da sequência codificadora 20K. Esse sítio capacita a fusão direta depois do códon para a serina Nº 213  
25 do 20K maduro com qualquer fragmento de DNA com uma extremidade sem corte. Uma reação de PCR correu com os iniciadores 20K\_Nco (SEQ ID NO: 11) e 20K\_NruXho (SEQ ID NO: 14) com o plasmídeo pALK1480 (Fig. 1) como o molde usando o programa A (Tabela 3). pALK1480 tem a cópia genômica de cel45A de *M. albomyces* (codificando a Cel45A ou 20K) inserida  
30 sob o promotor *T. reesei cbh1* como uma fusão exata e com o terminador *cbh1* a jusante do gene no vetor pUC19 (New England, Biolabs, Inc., EUA). A mistura de reação de PCR continha tampão de reação 1 x DyNAzyme®

EXT (Finnzymes, Finlândia),  $Mg^{2+}$  a 8 mM ( a concentração final ajustada com  $MgCl_2$  adicionado), dNTPs a 0,2 mM, 0,5  $\mu$ M de cada iniciador, 1,0 unidade de DNA polimerase DyNAzyme® (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 500 ng/100  $\mu$ L do molde. O produto de PCR foi digerido com enzimas de restrição NcoI e XhoI e o fragmento foi isolado do gel de agarose depois da eletroforese. O fragmento de 6,1 Kb semelhantemente cortado e isolado de pALK1480 foi ligado com o fragmento de PCR, e transformado em *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, EUA). O DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes, e um candidato adequado foi verificado por sequenciamento. O plasmídeo resultante foi designado como pALK1429.

As reações de PCR foram efetuadas separadamente como acima com pares de iniciadores 1\_BamMly (SEQ ID NO: 16) + XhoAge (SEQ ID NO: 15) e 2\_BamMly (SEQ ID NO: 17) +XhoAge (SEQ ID NO: 15) com pALK492 como o molde (Fig. 2) e os produtos de PCR resultantes, contendo o ligante e CBD, foram digeridos com MlyI (produzindo uma extremidade sem corte exatamente antes do primeiro códon desejado da sequência codificadora do ligante e CBD) e AgeI. pALK492 carrega cerca de 6,9 Kb do fragmento PstI de DNA cromossomal QM6a de *T. reesei* abrigando o gene *cbh1/cel7A* subclonado no sítio PstI de pUC19. pALK1429 obtido acima foi digerido com NruI e AgeI, e a parte do vetor foi isolada e ligada separadamente com os dois produtos de PCR digeridos obtidos acima, e transformada em XL1-Blue de *E. coli*. DNAs de plasmídeos foram isolados, verificados por sequenciamento e os plasmídeos resultantes foram designados como pALK1430 (carregando o produto de PCR 1\_BamMly + XhoAge como uma inserção) e como pALK1431 (carregando o produto de PCR 2\_BamMly + XhoAge como uma inserção).

**Tabela 1. Diferentes junções construídas entre 20K de *Melanocarpus albomyces* e o ligante CBHI + CBD de *Trichoderma reesei*.**

Nº construto	Junções núcleo-ligante	Molde do núcleo 20K pALK1480		Molde CBD + ligante pALK492		Construções de plasmídeos
		Iniciador 5'	Iniciador 3'	Iniciador 5'	Iniciador 3'	
1	...hddggfavíkaps.-gstgn...	20K_NcoI	20K-NruXho_GPI	1_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1434 <-pALK1430 <-pALK1429
2	...hddggfavíkaps.-ggnppg...	20K_NcoI	20K-NruXho_GPI	2_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1435 <- pALK1431 <-pALK1429
3	...hddggfa.fGP gs-tgn...	20K_NcoI_2	20K-NruXho_GPI	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1768 <- pALK1764 <-pALK1758
4	...hddggfWGEIgs-tgn...	20K_NcoI_3	20K-NruXho_WGEI	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1769 <- pALK1765 <-pALK1759
5	...hddggfPavQIPSS-tgn...	20K_NcoI_2	20K-NruXho_PavQIPS	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1770 <- pALK1766 <-pALK1760
6	...hddggfaWGEIgs-tgn...	20K_NcoI_3	20K-NruXho_WGEI-2	3_BamMly_oligo	XhoAge_oligo	pALK1775 <- pALK1774 <-pALK1773

Na segunda coluna, a parte mais à esquerda é a sequência derivada de *Melanocarpus* e a parte mais à direita é a sequência derivada de *Trichoderma*. Letras minúsculas indicam sequências originais, letras maiúsculas indicam a sequência modificada, período (.) indica um aminoácido anulado e um hífen indica o ponto de junção unido pela ligação dos plasmídeos relevantes. O primeiro aminoácido da sequência de *Melanocarpus* é a histidina N° 201 da sequência madura e nos construtos N° 1, N° 3, N° 4 e N° 6 o primeiro aminoácido da sequência *Trichoderma* é glicina N° 427, no construto N° 2 é glicina N° 434 e no construto N° 5 serina N° 428 da sequência madura.

**Tabela 2. Iniciadores usados**

Iniciador	Comprimentos	Sequência	ID Sequência NO:
20K_Nco	27	5'- TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGC	11
20K_Nco_2	35	5'-TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGCAGCGGGCGG	12
20K_Nco_3	46	5'-TACGCCATGGTCGTCCAGTCGACCAGCAGCGGGCGGGACCTCGGCA	13
20K_NruXho	40	5'-CGTACTCGAGTCATCGGAGGGGGCCTTGAAGACGGCGAA	14
XhoAge	30	5'-TGACTCGAGACCGGTGCGTCAGGCTTTCGC	15
1_BamMly	34	5'-TAGGATCCGAGTCCCATTGGCAGCACCGGCAACC	16
2_BamMly	36	5'-TAGGATCCGAGTCCCTAGCGGGCGCAACCCCTCCCAGC	17
3_BamMly	34	5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCCTAGCG	18
20K-NruXho_GPI	55	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCCGATGGGGCCGAAAGCGCCGTCGTCGTG	19
20K-NruXho_WGEI	52	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCCGATCTGCCCCAGAGCCCGTCGTCGTG	20
20K-NruXho_PavQIPS	58	5'CGTACTCGAGTCATCGCGAGGGGATCTGGACGGGGGAAGCCCGTCGTCGTG	21
20K-NruXho_WGEI-2	52	5'-CGTACTCGAGTCATCGCGAGCCCGATCTGCCCCAGCGCAAGCCCGTCGTC	22
50KB_NruIXhoI	37	5'-TCGTCTCGAGTCGCGATGGGGCCGAAGCGGATGTTGG	23
50KB_SphI	31	5'-GGAGGGCATGCCCAACAGCAGCGAGATCACC	24
2_50K_NruISpeI	38	5'-CGGCACTAGTTCGCGACCCCGATCTGCCCCAGCGCAGG	25
50K_XhoI	26	5' CGCCGAGGGCCGGCTCGAGAGCATCC	26

**Tabela 3. Programas de reação de PCR usados**

	Programa			
Etapa	A	B	C	D
1	95°C 5 min	95°C 5 min	98°C 1 min	98°C 1 min
2	95°C 1 min	95°C 1 min	98°C 30 s	98°C 30 s
3	55°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	65°C 30 s
4	72°C 1 min	72°C 1 min	GOTO 2 29x	72°C 1 min
5	GOTO 2 24x	GOTO 2 24x	72°C 10 min	GOTO 2 29x
6	4°C ESPERA	72°C 1 min	4°C ESPERA	72°C 10 min
7		4°C ESPERA		4°C ESPERA

O marcador amdS e a região flanqueadora cbh1 3' de *T. reesei* foram inseridas nos vetores pALK1430 e pALK1431 como se segue: pALK424 (Patente U.S. Nº 5.837.51; figura 3) foi cortado com EcoRI e SpeI, o fragmento resultante de 4,8 Kb foi deixado sem corte pela reação de preenchimento de Klenow, e ligado separadamente com plasmídeos pALK1430 e pALK1431 cortados com StuI, respectivamente, e transformado em XL1-Blue de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeos foram isolados e a orientação desejada das inserções foi averiguada por digestão com enzimas de restrição apropriadas. Os plasmídeos verificados foram designados como pALK1434 (inserção do pALK1430) e pALK1435 (inserção do pALK1431), respectivamente (Tabela 1).

Para os construtos Nº 3, Nº 4, Nº 5 e Nº 6 estabelecidos na Tabela 1 foi feita uma tentativa diferente. A sequência codificadora do 20K e de pontos de junção modificados diferentes (Tabela 1) foram designadas para terminar no códon que codifica serina, o qual forma uma parte do sítio Nrul adicionado. Para todos aqueles construtos a mesma inserção foi usada para fornecer a sequência codificante da maior parte do ligante e de CBD. O último foi construído como se segue: Uma reação de PCR foi efetuada com a mistura reacional descrita acima (exceto sem Mg<sup>2+</sup> adicionado) e usando o par de iniciadores 3\_BamMly (SEQ ID NO: 18) e XhoAge (SEQ ID NO: 15) e DNA de pALK492 como o molde. O programa B na Tabela 3 foi usado. O produto de PCR resultante foi digerido com BamHI e XhoI, isolado e ligado com a parte do vetor similarmente cortado de pBluescript II KS+ (Stratagene, EUA), e transformado em XL1 Blue de *E. coli*. o DNA de plasmídeo foi isola-

do, verificado por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificado por sequenciamento. Um plasmídeo candidato com a sequência desejada foi escolhido e designado como pALK1767.

5 Para o construto N° 3 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K\_Nco\_2 (SEQ ID NO: 12) e 20K-NruXho\_GPI (SEQ ID NO: 19) e DNA de pALK1480 como o molde. Duas misturas reacionais foram usadas: uma com a composição descrita acima para a construção de pALK1767 e a outra com DMSO adicionado para 3% (v/v). Essas duas misturas reacionais foram divididas e corridas com os programas C e D na Tabela 3. Todas as reações produziram fragmentos de DNA de tamanho esperado, e as preparações foram combinadas e digeridas com NcoI e XhoI. Os fragmentos de DNA foram isolados e ligados com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformados em XL1 Blue de *E. coli*. O DNA de plasmídeo foi isolado, verificado por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificado por sequenciamento. Um plasmídeo candidato com a sequência desejada foi escolhido e designado como pALK1758.

15 Para o construto N° 4 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K\_Nco\_3 (SEQ ID NO: 13) e 20K-NruXho\_WGEI (SEQ ID NO: 20) e DNA de pALK1480 como o molde. A mistura reacional de PCR continha tampão de reação 1x Phusion® GC (Finnzymes, Finlândia), dNTPs 0,2 mM, 0,5 µM de cada iniciador, DMSO a 3% (v/v) e 1,0 unidade de DNA polimerase Phusion® (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 70 ng/100 µL do molde. A mistura reacional foi dividida e corrida com os programas C e D na Tabela 3. Ambas as reações produziram fragmentos de DNA de tamanho esperado, e as preparações foram combinadas e digeridas com NcoI e XhoI. O fragmento de DNA foi isolado e ligado com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformado em XL1 Blue de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificados por sequenciamento. Um plasmídeo candidato com a sequência desejada foi escolhido e designado como pALK1759.

Para o construto Nº 5 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K\_Nco\_2 (SEQ ID NO: 12) e 20K-NruXho\_PavQIPS (SEQ ID NO: 21) e DNA de pALK1480 como o molde. Duas misturas reacionais foram usadas: uma com a composição descrita  
5 acima para a construção de pALK1759 e a outra sem DMSO. Essas duas misturas reacionais foram divididas e corridas com os programas C e D na Tabela 3. Todas as reações produziram fragmentos de DNA de tamanho esperado, e as preparações foram combinadas e digeridas com NcoI e XhoI. O fragmento de DNA foi isolado e ligado com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformados em XL1 Blue  
10 de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificados por sequenciamento. Um plasmídeo candidato foi escolhido e designado como pALK1760; ele adquiriu uma mutação no sítio XhoI único, mas isso não apresentou problema  
15 para a subclonagem adicional.

Para o construto Nº 6 na Tabela 1, uma reação de PCR foi efetuada usando o par de iniciadores 20K (SEQ ID NO: 13) e 20K-NruXho\_WGEI2 (SEQ ID NO: 22) e DNA de pALK1480 como o molde (70 ng/100  $\mu$ L). A mesma composição da mistura reacional foi usada par a construção do plasmídeo pALK1767, e ela correu com o programa C na Tabela 3.  
20 A preparação foi digerida com NcoI e XhoI. O fragmento de DNA foi isolado e ligado com um fragmento de 6,1 Kb isolado e semelhantemente cortado do pALK1480, e transformados em XL1 Blue de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição apropriadas e verificados por sequenciamento. Um plasmídeo candidato foi escolhido  
25 e designado como pALK1773.

Os plasmídeos pALK1758, pALK1759, pALK1760 e pALK1773 foram separadamente cortados com NruI e AgeI, e as partes do vetor foram isoladas. Cada preparação foi ligada com um fragmento de 235 pb isolado  
30 do pALK1767 depois da digestão com MlyI e AgeI, e cada mistura de ligação foi transformada separadamente em XL10-Gold de *E. coli*. Os DNAs de plasmídeo foram isolados, verificados por digestão com enzimas de restrição

apropriadas e verificados por sequenciamento. Os plasmídeos verificados foram designados como pALK1764, pALK1765, pALK1766, e pALK1774, respectivamente (Tabela 1).

5 O marcador amdS e a região flanqueadora 3' cbh1 de *T. reesei* foram inseridas em vetores pALK1764, pALK1765, pALK1766, e pALK1774 como se segue: pALK424 foi cortado com EcoR1 e Spe1, o fragmento de 4,8 Kb resultante foi tornado sem corte pela reação de preenchimento de Klenow e ligado separadamente com os plasmídeos pALK1764, pALK1765, pALK1766 e pALK1774 cortados com StuI, respectivamente, e transformados em XL10-Gold de *E. coli*. DNAs de plasmídeo foram isolados e a orientação desejada das inserções foi checada por digestão das enzimas de restrição apropriadas. Os plasmídeos verificados foram designados como pALK1768, pALK1769, pALK1770, e pALK1775, respectivamente (Tabela 1) (Fig. 10).

#### 15 **Exemplo 2. Produção das proteínas de fusão CBD + 20k em *T. reesei***

Cassetes de expressão linear de 8,7 Kb dos plasmídeos pALK1434 e pALK1435 foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão com EcoRI e transformados em protoplastos A47 de *T. reesei*. As transformações foram efetuadas conforme descrito em Penttilä *et al.* (1987) com as modificações descritas em Karhunen *et al.* (1993) selecionando com acetamida como a única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram purificados nas placas de seleção através de conídias individuais antes de serem esporuladas em PD (Ágar batata dextrose).

25 A produção de CBD + 20k dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias em um meio indutor de celulose complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 5% em pH 5,5. A atividade enzimática da proteína de fusão foi medida como a liberação dos açúcares redutores da carboximetilcelulose (CMC a 3%) a 50°C em tampão HEPES a 50 mM pH 7,0 em 10 min (atividade NCU, nkat; Bailey e Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). Atividades de NCU dos melhores trans-

formantes produtores estão apresentadas na Tabela 4. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots, nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A proteína CBD + 20k foi detectada dos sobrenadantes de cultura usando os anticorpos policlonais promovidos contra a celulase neutra de 20K de *Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004) e o sistema AP de Western blot ProtoBlot (Promega). A análise de Western blot mostrou que as enzimas CBD + 20k de fusão foram produzidas principalmente como proteínas de fusão estáveis em *T. reesei*.

**Tabela 4. Atividades NCU dos transformantes CBD + 20k selecionados de culturas de frasco de agitação**

Transformante	Nº da Construção	Número RF	Atividade da celulase neutra, NCU/mL	Fenótipo de celulase endógena
A47/pALK1434/Nº 20	Nº 1	RF5580	3278	CBHI-
A47/pALK1434/Nº 23	Nº 1	RF5581	2091	(CBHI+)
A47/pALK1434/Nº 37	Nº 1	RF5582	2330	CBHI-
A47/pALK1435/Nº 3	Nº 2	RF5583	3624	CBHI-
A47/pALK1435/Nº 7	Nº 2	RF5584	3211	CBHI-
A47/pALK1435/Nº 11	Nº 2	RF5585	1172	(CBHI+)
A47/pALK1435/Nº 14	Nº 2	RF5586	3152	CBHI-

Na Tabela 4, o número de construção se refere à Tabela 1; o número RF se refere àqueles onde os transformantes foram nomeados como cepas RF.

O direcionamento possível do cassete de expressão para o local *cbh1* (*cel7A*) foi varrido como um fenótipo CBHI negativo por Western blot. A detecção da proteína CBHI foi efetuada usando os anticorpos monoclonais CI-258 ou CI-261 (Aho *et al.*, 1991) e o sistema de Western blot ProtoBlot AP (Promega, EUA). Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots, nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda.

Cassetes de expressão lineares de 8,7 Kb dos plasmídeos pALK1768, pALK1769, pALK1770 e pALK1775 preparados no Exemplo 1 foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão de *EcoRI* e trans-

formados em protoplastos RF5796 e RF5798 de *T. reesei* (ambas as cepas originadas da cepa QM6a (Bailey e Nevalainen, 1981) e com o fenótipo C-BHI- CBHII- EGI- EGII- para as celulasas *T. reesei* endógenas) selecionando com acetamida como a única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram  
5 purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de serem esporuladas em PD.

A produção de CBD + 20k dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias em um meio indutor de celulase complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% em pH 5,5.  
10 A atividade NCU das proteínas de fusão CBD + 20k produzidas foi, a seguir, ensaiada conforme descrito acima. As atividades NCU dos transformantes selecionados estão apresentadas na Tabela 5. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots nos quais  
15 várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A proteína CBD + 20k foi detectada a partir dos sobrenadantes de cultura usando os anticorpos policlonais levantados contra a celulase neutra 20K de *M. albomyces* (Haakana *et al.* 2004) e o sistema AP de Western blot ProtoBlot (Promega, EUA). A análise de Western blot mostrou que a enzima CBD + 20k de fusão foi produzida pelos  
20 transformantes. Algumas culturas mostraram também uma banda reagindo com o antissoro anti-20K e com a mobilidade da proteína 20K do tipo selvagem, indicando que possivelmente alguma clivagem do ligante + CBD ocorreu durante o cultivo. A proteína de fusão CBD + 20k produzida pelos transformantes pALK1770 foi escolhida em estudos adicionais devido à sua estabilidade.  
25

**Tabela 5. Atividades NCU dos transformantes CBD + 20k dos cultivos do frasco de agitação**

Transformante	No. de construção	Número RF	Atividade da celulase neutra, NCU/mL
RF5796/pALK1768/Nº 6	Nº 3	RF5966	3622
RF5796/pALK1768/Nº 7	Nº 3	RF5967	1316
RF5796/pALK1768/Nº 9	Nº 3	RF6035	6605
RF5798/pALK1768/Nº 11	Nº 3	RF5970	1525
RF5798/pALK1768/Nº 17	Nº 3	RF5971	2885
RF5798/pALK1768/Nº 20	Nº 3	RF5972	2598
RF5796/pALK1769/Nº 7	Nº 4	RF5968	4344
RF5796/pALK1769/Nº 10	Nº 4	RF5969	4858
RF5796/pALK1769/Nº 11	Nº 4	RF6036	6145
RF5798/pALK1769/Nº 4	Nº 4	RF5973	4505
RF5798/pALK1769/Nº 8	Nº 4	RF5974	4895
RF5796/pALK1770/Nº 13	Nº 5	RF5975	3073
RF5796/pALK1770/Nº 17	Nº 5	RF5976	2256
RF5796/pALK1770/Nº 22	Nº 5	RF5977	2107
RF5798/pALK1770/Nº 10	Nº 5	RF5978	1907
RF5798/pALK1770/Nº 14	Nº 5	RF5979	3661
RF5796/pALK1775/Nº 8	Nº 6	RF6078	2431
RF5796/pALK1775/Nº 13	Nº 6	RF6079	3505
RF5796/pALK1775/Nº 21	Nº 6	RF6080	2541
RF5798/pALK1775/Nº 22	Nº 6	RF6081	1697
RF5798/pALK1775/Nº 29	Nº 6	RF6082	3096

Na Tabela 5, o número de construção se refere à Tabela 1; o número RF se refere àqueles onde os transformantes foram nomeados como cepas RF.

Cepas RF5582, RF5583, RF6036, RF5977 e RF5978 de *T. reesei* cresceram em um biorreator para testes de aplicações. Algumas preparações foram tratadas por aquecimento (pH 6,0, 65°C, 60 - 70 min) para inativar qualquer atividade de enzima endógena de *T. reesei* remanescente.

CBD + 20k é relativamente estável ao aquecimento (Miettinen-Oinonen *et al.* 2004), e não desnatura durante o tratamento.

### **Exemplo 3. Produção das proteínas mutantes de afinidade CBD + 20k de fusão em *T. reesei***

Enzima 20K de *Melanocarpus albomyces* (*cel45A*, ACNº AJ515703)

foi fundida com o domínio de ligação à celulose (CBD) de CBHI de *Trichoderma reesei* no qual os resíduos de tirosina conservados nas posições 31 (correspondendo ao Y492 do polipeptídeo maduro) e/ou 32 (correspondendo ao Y493 do polipeptídeo maduro) foram modificados para alanina conforme descrito por Linder *et al.*, 1995. Além disso, o resíduo de tirosina na posição 31 foi substituído por triptofano, um aminoácido naturalmente encontrado na região CBD de, por exemplo, *Humicola grisea* CBHI (Azevedo *et al.*, 1990) e *T. reesei* EGV (Cel45A, Saloheimo *et al.*, 1994). Os CBDs modificados foram construídos por PCR e as substituições dos aminoácidos de Y31A, Y32A, Y31W e Y31A\_Y32A foram incluídas no domínio de ligação à celulose do CBHI de *T. reesei* (numeração de acordo com a sequência de aminoácidos do CBD). Em todos os construtos, o iniciador "forward" 3\_BamMly: 5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCG-3' (SEQ ID. NO: 18) foi usado. Os iniciadores reversos usados para a amplificação de diferentes produtos CBD<sub>mut</sub> estão descritos na Tabela 6. As misturas de reação de PCR continham tampão reacional 1 x PfuUltra® HF (Stratagene, EUA) fornecendo concentração de Mg<sup>2+</sup> a 2 mM, dNTPs a 0,2 mM, 2 μM de cada iniciador e 1,5 unidade de DNA polimerase PfuUltra® HF (Stratagene, EUA) e aproximadamente 45 ng de plasmídeo pALK492 como molde. O plasmídeo pALK492 (Fig. 2) contém o gene *cbh1* de *T. reesei*. As condições para as reações de PCR foram as seguintes: 2 min de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min de anelamento a 65°C (gradiente de ± 5°C), 2 min de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 min.

Tabela 6. Iniciadores de PCR reverso projetados para amplificar produtos de CBD modificados

Iniciador	Comprimento (nts)	Sequência, reversa	Substituição de aminoácido	ID de sequência NO:
XhoAge_Y31A	69	5'-TGACTCGAGACCCGGTGGCTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGTAGGCAGGGTTTCAGG	Y31A	SEQ ID. NO: 27
XhoAge_Y32A	69	5'-TGACTCGAGACCCGGTGGCTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGGGCGTAAGGGTTTCAGG	Y32A	SEQ ID. NO: 28
XhoAge_Y31W	69	5'-TGACTCGAGACCCGGTGGCTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGTACCAAGGGTTTCAGG	Y31W	SEQ ID. NO: 29
XhoAge_Y31A-Y32A	69	5'-TGACTCGAGACCCGGTGGCTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGCCACTGAGAGGGCGGCAGGGTTTCAGG	Y31A_Y32A	SEQ ID. NO: 30

Todas as combinações de PCR produziram o fragmento de DNA específico nas reações de PCR na temperatura de anelamento de 60°C. Os produtos de PCR foram isolados dessas reações, digeridos com enzimas de restrição XhoI e BamHI e, a seguir, clonados para o pBluescript II KS+ (Stratagene, EUA). Os plasmídeos obtidos foram nomeados como pALK1884 (mutação Y31A), pALK1885 (mutação Y32A), pALK1886 (mutação Y31W) e pALK1887 (mutações Y31A\_Y32A). Os fragmentos de PCR nos plasmídeos foram confirmados por sequenciamento. As inserções digeridas MlyI e AgeI dos plasmídeos pALK1884 a pALK1887 foram ainda ligadas a um fragmento de vetor pALK1760 digerido com NruI e AgeI contendo o gene 20K de *Melanocarpus albomyces* de comprimento total fundido com o terminador e promotor *cbh1* (*cel7A*) de *T. reesei*. A parte C terminal do gene 20K no pALK1760 foi modificada de forma que a ligação do fragmento CBD produziu um ponto de junção de PAVQIPSS (construto N° 5) o qual mostrou resultar em um produto de fusão estável em *T. reesei* conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. Na etapa final, o marcador *amdS* foi adicionado como um fragmento SpeI-EcoRI de extremidade sem corte (4,5 Kb) do plasmídeo p3SR2 (Fig. 6) para obter plasmídeos de expressão de pALK1877 (mutação Y31a), pALK1878 (mutação Y32A), pALK1879 (mutação Y31W) e pALK1880 (mutação Y31A\_Y32A) para a produção de enzimas CBD + 20k<sub>mut</sub> de fusão em *T. reesei*. As sequências de aminoácidos da proteína 20K de fusão ao peptídeo ligante, seguidas pela região CBD modificada estão apresentadas na figura 11B. Os plasmídeos de expressão foram conformados por sequenciamento, e os cassetes de expressão lineares de 8,4 Kb (Fig. 11A) foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão com NotI e foram transformados em protoplastos RF5796 de *T. reesei*. As transformações foram efetuadas em Pentillä *et al.* (1987) com as modificações descritas em Karhunen *et al.* (1993), selecionando com acetamida como a única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de serem esporuladas em PD.

A produção de CBD + 20k<sub>mut</sub> dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50

mL). Os transformantes cresceram por 7 dias em um meio indutor de celulase complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 5% em pH 5,5. A atividade enzimática da proteína de fusão foi medida como a liberação dos açúcares redutores da carboximetilcelulose (CMC 3%) a 50°C em tampão Hepes 50 mM a pH 7,0 em 10 min (atividade NCU, nkat; Bailey e Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). Atividades de NCU dos melhores transformantes produtores estão apresentadas na Tabela 7. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots, nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A proteína CBD + 20k<sub>mut</sub> foi detectada dos sobrenadantes de cultura usando os anticorpos policlonais promovidos contra a celulase neutra de 20K de *Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004) e o sistema AP de Western blot ProtoBlot (Promega). A análise de Western blot mostrou que as enzimas CBD + 20k<sub>mut</sub> de fusão foram produzidas principalmente como proteínas de fusão estáveis em *T. reesei*.

**Tabela 7. Atividades NUC dos transformantes CBD + 20k<sub>mut</sub> selecionados a partir de cultivo de frasco de agitação**

Transformante	Substituição de aminoácido	Número RF	Atividade de celulase neutra, NCU/mL
pALK1877/Nº 26	Y31A	RF6084	3658
pALK1877/Nº 34	Y31A	RF6085	2447
pALK1878/Nº 02	Y32A	RF6086	3434
pALK1878/Nº 13	Y32A	RF6088	2915
pALK1879/Nº 13	Y31W	RF6090	2545
pALK1879/Nº 24	Y31W	RF6091	3452
pALK1880/Nº 06	Y31A_Y32A	RF6092	3415
pALK1880/Nº 25	Y31A_Y32A	RF6094	2727

Número RF se refere àquele com a qual os transformantes foram nomeados como cepas RF.

As cepas de RF6084 a RF6086, RF6088, RF6090 a RF6092 e RF6094 foram, fermentadas para obter material para os testes de aplicação (ver Exemplos 9 - 11).

**Exemplo 4. Produção das proteínas de anulação de ligante CBD + 20k de fusão em *T. reesei***

Enzima 20K de *Melanocarpus albomyces* foi fundida com o do-

mínio de ligação à celulose (=CBD) do CBHI de *Trichoderma reesei*, o qual foi ainda modificado pela introdução de anulações no peptídeo ligante interdomínio. As anulações do ligante foram projetadas de acordo com Srisodsuk *et al.*, 1993. A anulação de aminoácidos da posição 434 até a 444 (mutante  $\Delta$ G-444) do polipeptídeo maduro remove aproximadamente um terço do ligante incluindo a sequência repetida rica em glicina e em prolina, mas deixando todos os sítios de O-glicosilação putativos intactos. A anulação dos resíduos da posição 434 até a posição 460 (Mutante  $\Delta$ G-460) remove praticamente todo o ligante (Fig. 12A). Anulações de ligante CBD + 20k adicionais com uma mutação de dupla afinidade de Y31A\_Y32A na região CBD foram também construídas.

Reações de PCR foram efetuadas para introduzir as anulações ao peptídeo ligante assim como a substituição do aminoácido à região CBD. As amplificações de PCR foram feitas conforme descrito no Exemplo 3, exceto que a temperatura de anelamento de 60°C (gradiente de  $\pm$  5°C) foi usada. Os iniciadores "forward" 5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCA CCACCAC-CACCCGCCGCCAGCC-3' (SEQ ID. NO: 31) e 5'-TAGGATCCGAGTCCCATTACCGGCAACCCTAGCCCTACCCAGTCTCACTACGGCC AGTGC-3' (SEQ ID. NO: 32) foram usados para sintetizar as anulações do ligante de  $\Delta$ G-444 e do  $\Delta$ G-460, respectivamente. Correspondentemente, o iniciador reverso 5'-TGA CT CGAGACCGGTGCGTCAGGCTTT CGCACGGA GCTTTACAGG-3 (SEQ ID. NO: 33) foi usado para amplificar a região CBD intacta do CBHI de *T. reesei*. A mutação Y31A\_Y32A da região CBD foi gerada com o iniciador reverso 5'-TGA CT CGAGACCGGTGCGTCAGGCTTT CGCACGGAGCTTTACAGGCACTGAGAGGCGGCAGGGTTCAGG-3' (SEQ ID. NO: 30).

Todas as combinações de iniciadores produziram o fragmento de DNA específico nas reações de PCR na faixa de 55,2°C até 65,0°C de temperaturas de anelamento. Os plasmídeos de expressão pALK1893 (anulação  $\Delta$ G-444 ), pALK1896 (anulação  $\Delta$ G-460), pALK1899 (anulação  $\Delta$ G-444, mutação Y31A\_Y32A) e pALK1952 (anulação  $\Delta$ G-460, mutação

Y31A\_Y32A) foram construídos conforme descrito no Exemplo 3. As sequências de aminoácidos da proteína de fusão 20K para o peptídeo ligante cortado seguido pelo CBD intacto ou modificado estão apresentadas na figura 12B. Os cassetes de expressão linear de 8,3 Kb foram isolados da estrutura do vetor depois da digestão por EcoRI e foram transformados em protoplastos RF5796 de *T. reesei*. Transformação, purificação transformante, culturas de frasco de agitação, medições de atividade, hibridizações por Southern blot, e análises de Western blot foram efetuadas conforme descrito no Exemplo 3.

10 **Tabela 8. Atividades NCU dos transformantes de anulação de ligante CBD + 20K selecionados a partir do cultivo de frascos de agitação**

Transformante	Anulação do ligante / substituição do aminoácido	Número RF	Atividade da celulase neutra, NCU/mL
pALK1893/Nº 08	$\Delta$ G-444	RF6107	1182
pALK1893/Nº 10	$\Delta$ G-444	RF6108	2058
pALK1896/Nº 05	$\Delta$ G-460	RF6110	2576
pALK1896/Nº 07	$\Delta$ G-460	RF6111	2628
pALK1899/Nº 07	$\Delta$ G-444, Y31A_Y32A	RF6112	1947
pALK1899/Nº 20	$\Delta$ G-444, Y31A_Y32A	RF6114	2462
pALK1952/Nº 01	$\Delta$ G-460, Y31A_Y32A	RF6115	2428
pALK1952/Nº 17	$\Delta$ G-460, Y31A_Y32A	RF6116	1738

O número RF se refere àquele com o qual os transformantes foram nomeados como cepas RF.

15 As cepas selecionadas RF6107, RF6108, RF6110 até RF6112 e RF6114 até RF6116 foram fermentadas para obter material para os testes de aplicação (Exemplos 9 a 11). A análise de Western blot mostrou que as enzimas de anulação de ligante CBD + 20K de fusão foram produzidas como proteínas de fusão estáveis em *T. reesei*.

20 **Exemplo 5. Produção da proteína de fusão 50K + CBD de *Melanocarpus albomyces* recombinante em *T. reesei*.**

Construtos de plasmídeos foram projetados para juntar a sequência codificadora de 50K de *Melanocarpus albomyces* (cel7A, ACNº AJ515704) com a região ligante e o domínio de ligação à celulose (CBD) do

CBHI de *T. reesei* (*cel7A*, ACNº AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993). Plasmídeo pALK1237 (Fig. 4), o qual é uma base para os novos construtos, contém o gene *cel7A* sob controle do promotor *cbh1* de *T. reesei* como uma fusão exata.

5                   Primeiro, um único sitio de restrição NruI foi introduzido próximo do C-terminal da sequência codificadora 50K. Isso capacita a fusão direta de qualquer DNA sem corte depois do aminoácido S393 do polipeptídeo 50K maduro (Fig. 13B). Uma reação de PCR foi efetuada com os iniciadores 2\_50K\_NruISpeI (5' CGGCACTAGTTCGCGACCCGATCTCGCCCCAGCGCAGG 3';  
10                   SEQ ID. NO: 25) e 50K\_XhoI (5' CGCCGAGGGCCGGCTCGAGAGCATCC 3'; SEQ ID. NO: 26) usando pALK1237 como um molde. A reação de PCR continha 1 x de tampão de reação DyNAzyme® EXT (Finnzymes, Finlândia), dNTPs a 0,25 mM, 0,5 µM de cada iniciador, 2,0 unidades de DNA polimerase de DyNAzyme® EXT (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 50  
15                   ng/100 µL de DNA molde pALK1237. As condições para a amplificação por PCR foram como se segue: 5 min de desnaturação inicial a 96°C, seguido por 25 ciclos de 15 s a 96°C, anelamento de 60 s a 56°C ou 61°C, 60 s de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e SpeI e purificado a partir de  
20                   gel de agarose. O fragmento de PCR purificado foi ligado no fragmento de restrição XhoI-SpeI de 6,9 Kb do plasmídeo pALK1237 e transformado em XL1-Blue de *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes e três candidatos foram verificados por sequenciamento. O clone selecionado foi designado como pALK1703.

25                   O ligante CBHI + CBD de *T. reesei* foi amplificado por PCR com iniciadores 3\_BamMly\_50 (5'TTGGATCCGAGTCGCAGCACCCGGCAACCC TAGCG 3'; SEQ ID. NO: 36) e XhoAge (5' TGA<sup>ACT</sup>CGAGACCGGTGCGT-CAGGCTTTCGC 3'; SEQ ID. NO: 15) usando pALK492 como molde. As condições de reação de PCR foram conforme descritas acima, exceto que o  
30                   tempo de extensão na reação de amplificação foi de 90 s. O produto de PCR foi digerido com enzimas MlyI e AgeI e purificado a partir de gel de agarose. O fragmento de PCR contendo o ligante + CBD foi ligado no fragmento de

restrição AgeI-NruI de 6,8 Kb de pALK1703 e transformado em XL1-Blue *E. coli* (Stratagene, EUA). Os transformantes foram analisados conforme descrito acima e um clone adequado foi designado como pALK1704.

5 Para capacitar a seleção de transformantes de *T. reesei* o gene marcador *amdS* e a região flanqueadora 3' *cbhl* de *T. reesei* foi inserida no plasmídeo do vetor pALK1704. Um fragmento de restrição EcoRI-SpeI de 4,8 Kb de pALK424 (US 5.837.515) foi isolado e as extremidades do fragmento foram preenchidas com enzima Klenow. O fragmento marcador *amdS* de extremidade sem corte foi ligado no pALK1704 digerido StuI e transformado em XL1-Blue *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado a partir de transformantes e a orientação desejada da inserção foi verificada pela digestão da enzima de restrição. O transformante selecionado foi designado como pALK1708.

15 Um cassete de expressão linear de 9,2 Kb (Fig. 13A) da estrutura pALK1708 foi isolado por digestão por EcoRI, transformado em protoplastos RF5636 de *T. reesei* (derivados da cepa QM6a; Bailey e Nevalainen, 1981), e transformantes selecionados com acetamida como a única fonte de nitrogênio. A cepa do hospedeiro não tem três celulasas endógenas principais: CBHII (Cel6A), EGI (Cel7B) e EGII (Cel5A). A transformação foi efetuada de acordo com Penttillä *et al.* (1987) com modificações descritas por Karhunen *et al.* (1993). Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de esporular as mesmas em PD.

25 A produção da proteína de fusão 50K + CBD dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura de criações de frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias em um meio indutor de celulose complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5% em pH 5,5. A atividade enzimática da proteína de fusão foi medida como a liberação dos açúcares redutores da carboximetilcelulose (CMC 3%) a 50°C em tampão HEPES 50 mM pH 7,0 em 10 min (atividade NCU; Bailey e Nevalainen, 1981; Haakana *et al.*, 2004). A atividade dos transformantes variou de 2035 a 3633 NCU/mL. A proteína 50K + CBD foi detectada a partir do sobrenadante da cultura por sistema AP de Western blot ProtoBlot (Prome-

ga) usando anticorpos policlonais promovidos contra a celulase neutra 50K de *Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004). A análise de Western blot mostrou que a proteína de fusão 50K + CBD produzida de *T. reesei* é estável. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por Southern blotting usando o cassete de expressão como uma sonda. O alvejamento possível do cassete de expressão para o local *cbh1* também foi verificado por Western blotting usando anticorpos CBHI monoclonais (CI-261, Aho *et al.*, 1991) para detectar a proteína CBHI.

**Exemplo 6. Produção da proteína de fusão 50KB+CBD de *Melanocarpus albomyces* recombinante em *T. reesei*.**

Construtos de plasmídeo foram projetados para se juntar à sequência codificadora 50K de *Melanocarpus albomyces* (*cel7B*, ACN° AJ515705) que codifica a sequência com a região ligante e o domínio de ligação à celulose (CBD) do CBHI de *T. reesei* (*cel7A*, ACN° AR088330; Srisodsuk *et al.* 1993). Plasmídeo pALK1241 (Fig. 5), o qual é uma base para os novos construtos, contém o gene *cel7B* sob controle do promotor *cbh1* de *T. reesei* como uma fusão exata.

Primeiro, um único sítio de restrição NruI foi introduzido próximo do C-terminal da sequência codificadora 50KB. Isso capacita a fusão direta de qualquer DNA sem corte depois do aminoácido S426 do polipeptídeo 50KB maduro (Fig. 14B). Uma reação de PCR foi efetuada com os iniciadores 50KB\_NruIXhoI (5' TCGTCTCGAGTCGCGATGGGGCCGAAGCGGATGTTGG 3'; SEQ ID. NO: 23) e 50KB\_SphI (5' GGAGGGCATGCCCAACAGCAGCGAGATCACC 3'; SEQ ID. NO: 24) usando pALK1241 como molde. A reação de PCR continha tampão de reação 1 x DyNAzyme® (Finnzymes, Finlândia), dNTPs a 0,25 mM, 0,5 µM de cada iniciador, 2,0 unidades de DNA polimerase de DyNAzyme® EXT (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 50 ng/100 µL de DNA molde pALK1241. As condições para a amplificação por PCR foram como se segue: 5 min de desnaturação inicial a 96°C, seguido por 25 ciclos de 15 s a 96°C, anelamento de 60 s a 56°C ou 61°C, 60 s de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 min. O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e SphI e puri-

ficado a partir de gel de agarose. O fragmento de PCR purificado foi ligado no fragmento de restrição XhoI-SpeI de 6,9 Kb do plasmídeo pALK1241 e transformado em XL1-Blue de *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes e um candidato foi verificado por sequenciamento. O clone selecionado foi designado como pALK1705.

O ligante CBHI + CBD de *T. reesei* foi amplificado por PCR com os iniciadores 3\_BamMly\_50 (5' TTGGATCCGAGTCGCAGCACCGGCAACCCTAGCG 3'; SEQ ID. NO: 18) e XhoAge (5' TGA CT CGAGACCGGTGC GTCAGGCTTTCGC 3'; 15) usando pALK492 como molde. As condições da reação de PCR foram conforme é descrito acima, exceto que o tempo de extensão na reação de amplificação foi de 90 s. O produto de PCR foi digerido com enzimas MlyI e AgeI e purificado a partir de gel de agarose. O ligante + CBD contendo fragmento de PCR foi ligado no fragmento de restrição AgeI-NruI de 7,2 Kb de pALK1705 e transformado em XL 1-Blue *E. coli* (Stratagene, EUA). Os transformantes foram analisados conforme descrito acima e um clone adequado foi designado como pALK1706.

Para capacitar a seleção de transformantes de *T. reesei* o gene marcador andS e a região flanqueadora 3' cbhI de *T. reesei* foram inseridos no plasmídeo do vetor pALK1706. Um fragmento de restrição de EcoRI-SpeI de 4,8 Kb de pALK424 (US 5.837.515) foi isolado e as extremidades do fragmento foram preenchidas com enzima Klenow. O fragmento do marcador andS de extremidade sem corte foi ligado no pALK1706 digerido com StuI e transformando em XLI-Blue *E. coli* (Stratagene, EUA). DNA de plasmídeo foi isolado dos transformantes e a orientação desejada da inserção foi verificada pela digestão da enzima de restrição. O transformante selecionado foi designado como pALK1709.

Um cassete de expressão linear de 9,6 Kb (Fig. 14A) da estrutura pALK1709 foi isolado por digestão de EcoRI, transformado em protoplastos RF5636 de *T. reesei*, e os transformantes selecionados com acetamida como a única fonte de nitrogênio. A cepa do hospedeiro não tem três células endógenas principais: CBHII (Cel6A), EGI (Cel7B) e EGII (Cel5A). A transformação foi efetuada de acordo com Penttillä et al. (1987) com modifi-

cações descritas por Karhunen *et al.* (1993). Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídias simples ante de esporular as mesmas em PD.

A produção da proteína de fusão 50KB + CBD dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura das culturas de frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias em um meio indutor de celulose complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5% em pH 5,5. A atividade enzimática da celobio-hidrolase da proteína de fusão foi medida usando substrato de 4-metilumbelferil- $\beta$ -D-lactosídeo (atividade MUL; van Tilbeurgh *et al.* 1988). A proteína 50KB + CBD foi detectada a partir dos sobrenadantes da cultura por sistema AP de Western blot Pro-  
toBlot (Promega) usando anticorpos policlonais levantados contra a celulase 50KB de *Melanocarpus albomyces* purificada (Haakana *et al.* 2004). Na análise de Western blot nenhuma proteína de 50KB do tipo selvagem foi detectada mostrando que a proteína de fusão 50KB + CBD produzida a partir de *T. reesei* é estável. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por Southern blotting usando o cassete de expressão como uma sonda. O alvejamento possível do cassete de expressão para o local *cbhl* também foi verificado por Western blotting usando anticorpos CBHI monoclonais (CI-261, Aho *et al.*, 1991) para detectar a proteína CBHI.

#### **Exemplo 7. Produção das proteínas de fusão CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante em *T. reesei***

CBHI de *Thermoascus aurantiacus* (ACN<sup>o</sup> AF478686, Hong *et al.*, 2003; SEQ ID. NO: 9) foi fundido com o ligante e CBD de CBHI de *Trichoderma reesei* (ACN<sup>o</sup> AR088330, Srisodsuk *et al.* 1993; SEQ ID. NO: 3). Primeiro, a sequência codificadora do ligante e o CBD de CBHI de *T. reesei* foi sintetizada por PCR usando os seguintes iniciadores: 5'-TTAAACA TATGTTATCTACTCCAACATCAAGGTCGGACCCATTGGCAGCACCGGCA ACCCTAGCGGC-3' (sequência "forward", SEQ ID. NO: 34) e 5'-TATATG CGGCCGCACCGGTGCGTCAGGCTTTCGCACGGAGCTTTACAGGC-3' (sequência reversa, SEQ ID. NO: 35).

A mistura de reação de PCR continha 1 x de tampão de reação

DyNAzyme® EXT (Finnzymes, Finlândia),  $Mg^{2+}$  a 15 mM., dNTPs a 0,2 mM, 2  $\mu$ M de cada iniciador, 0,6 unidade de DNA polimerase de DyNAzyme® EXT (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 75 ng/30  $\mu$ L de molde pALK492. O plasmídeo pALK492 contém o gene *cbh1* (*cel7A*) de *T. reesei*.

5 As condições para a reação de PCR foram as seguintes: 2 min de desnaturação inicial a 98°C, seguido por 30 ciclos de 30 seg a 98°C, 30 seg de anelamento a 68°C (gradiente de  $\pm 4^\circ$ C), 30 seg de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 min. O fragmento de DNA específico na reação de PCR foi obtido na faixa de temperatura de anelamento de 64°C até 68,5°C.

10 O fragmento CBD sintetizado, contendo também a sequência de nucleotídeos 3'-terminal do gene *cbh1* de *Thermoascus aurantiacus* foi digerido pelas enzimas de restrição NdeI e NotI e o fragmento foi isolado a partir de gel de agarose depois da eletroforese. Depois disso, o fragmento de PCR isolado foi ligado ao fragmento de vetor pALK digerido por NdeI e NotI (Fig. 7)

15 contendo o gene *cbh1* de *Thermoascus aurantiacus* de comprimento completo. O plasmídeo obtido foi nomeado como pALK1888, e o fragmento de PCR amplificado no plasmídeo foi confirmado por sequenciamento. Como resultado da fusão, a parte C-terminal do CBHI de *Thermoascus aurantiacus* no plasmídeo pALK1888 contém um ponto de junção de GPIGST (Fig. 15B).

20 A inserção digerida SacII e AgeI do plasmídeo pALK1888 foi ligada ao fragmento do vetor pALK1694 digerido SacII e AgeI (Fig. 8), o que resulta na fusão CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* ao terminador e promotor (uma fusão exata) *cbh1* de *T. reesei* (*cel7A*). No passo final, o fragmento marcador *amdS* foi adicionado, conforme descrito no Exemplo 3, para obter

25 o plasmídeo de expressão de pALK1890 para a produção da enzima de fusão CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante em *T. reesei*. A sequência de aminoácidos da fusão da proteína CBHI de *Thermoascus aurantiacus* com o peptídeo ligante seguido pela região CBD de CBHI de *T. reesei* é apresentada na figura 15B.

30 O plasmídeo de expressão foi confirmado pelas digestões da enzima de restrição, e o cassete de expressão linear de 8,9 Kb (Fig. 15A) foi isolado da estrutura do vetor depois da digestão NotI e foi transformado nos

protoplastos RF5796 de *T. reesei*. As transformações foram efetuadas como em Pentillä *et al.* (1987) com as modificações descritas em Karhunen *et al.* (1993). Os transformantes foram purificados em placas de seleção através de conídias individuais antes de esporular as mesmas em PD.

5           A produção de CBHI + CBD de *Thermoascus aurantiacus* dos transformantes foi analisada através dos sobrenadantes de cultura das culturas do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram por 7 dias em um meio de indução de celulase complexo (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 5% em pH 5,5. A atividade da celobio-hidrolase foi avaliada usando substrato de 4-metilumbelferil- $\beta$ -D-lactosídeo (MUL) de acordo com van Tilbeurgh *et al.* 1988. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados pelo uso de Southern blots nos quais várias digestões genômicas foram incluídas e o cassete de expressão foi usado como uma sonda. A análise de SDS-PAGE mostrou que a enzima CBHI + CBD *Thermoascus aurantiacus* recombinante foi produzida como uma proteína de fusão estável em *T. reesei*.

#### **Exemplo 8. Desempenho das preparações de proteína CBD + 20K de fusão em acabamento/desbotamento de sarja de Nimes**

20           Proteínas de fusão CBD + 20K produzidas usando *Trichoderma* como hospedeiro conforme descrito no Exemplo 2 foram testadas quanto à sua capacidade em desbotamento da sarja de Nimes para criar uma aparência abradada semelhante àquela fornecida por pedra-pomes. Uma preparação de 20K comercial eficiente no acabamento de sarja de Nimes foi usada para comparação.

25           Jeans inglês feito de sarja de Nimes corada com índigo com fundo de enxofre foi usado como material de teste depois de desgomar com alfa-amilase ECOSTONE® A200. Fios urdidos e tramados no tecido foram transformados em fios de algodão torcido ("ring spun"). Os tratamentos de celulase foram efetuados com extrator de lavagem Wascator FOM 71 CLS da Electrolux sob condições descritas na Tabela 9.

**Tabela 9. Condições e teste usadas nos tratamentos de celulase**

Parâmetro de processo	
Carga de sarja de Nimes	1.3 Kg
Água	19 l
Tampão / controle de pH (pH 6,5)	31,6 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 10,5 g de ácido cítrico
Tempo	55 min
Temperatura	60°C
Dosagem de celulase	250 - 3000 NCU/g de tecido

As enzimas foram dosadas como unidades de atividade de celulase neutra (NCU) por peso de tecido. A enzima celulase foi inativada depois da drenagem pela elevação do pH acima de 11 pela adição de 5 g de NaOH (10 min, 40°C) e pelo enxágue três vezes. Os jeans foram secos em um tambor secador de roupa. Dois pares de jeans foram usados em cada teste.

O nível de efeito de desbotamento/abrasão foi avaliado pela medição da cor como valores de reflectância com espectrofotômetro Minolta CM 2500 ou CM 1000 usando coordenadas de espaço de cor L\*a\*b\* (iluminador D65/2°). A cor do lado da face e o lado reverso da sarja de Nimes (dados não mostrados) foi medida depois da desgomagem (isto é, antes do tratamento com celulase) e depois do tratamento com celulase. Cada medição foi a média de aproximadamente 40 medidas. Dois pares de jeans foram usados em cada teste e o resultado final é a média deles. A claridade ou o aumento da claridade depois do tratamento com a enzima foi usado para a avaliação do efeito de abrasão (desempenho ou efeito de desbotamento). Os resultados estão mostrados nas Tabelas 10 e 11, onde o negrito é usado para ressaltar os níveis de abrasão semelhantes e as dosagens equivalentes. Os tratamentos com 20K ou sem qualquer enzima foram usados para comparação. Algumas das preparações (Tabela 11) foram tratadas com aquecimento (pH 6,0, 65°C, 60 a 70 min) para inativar qualquer atividade enzimática endógena de *T. reesei* remanescente e/ou para testar o efeito do tratamento com aquecimento na estabilidade da enzima.

Tabela 10. Medições de cor do lado da face da sarja de Nimes tratada com proteínas de fusão CBD + 20K

Nº da Cepa	Enzima	NCU/ g de tecido	Tratamento antes da celulase		Tratamento depois da celulase		Aumento de L*
			L*	b*	L*	b*	
-	Sem enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K <sup>1</sup>	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K <sup>1</sup>	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF6036	CBD + 20K	500	16,41	-10,14	22,80	-14,19	6,40
RF5977	20K +CBD	250	16,68	-9,91	22,81	-14,47	6,13
RF5977	20K +CBD	500	16,73	-10,01	24,07	-14,70	7,34
RF5977	20K +CBD	1500	16,71	-9,68	25,63	-14,79	8,93

L\* indica a claridade, -b\* indica a direção do azul, +b\* indica a direção do amarelo.

<sup>1</sup>Preparação comercial

Tabela 11. Medições de cor do lado da face da sarja de Nimes tratada com proteínas de fusão CBD + 20K tratadas com aquecimento.

Nº da Cepa	Enzima	NCU/g de tecido	Tratamento antes da celulase		Tratamento depois da celulase		Aumento de L*
			L*	b*	L*	B*	
-	Sem enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K <sup>1</sup> (não tratado com aquecimento)	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K <sup>1</sup> (não tratado com aquecimento)	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF5206	20K CBHI-	3000	16,80	-10,00	22,61	-14,59	5,81
RF5582	20K+ construto CBD Nº 1, CBHI-	3000	16,83	-10,01	26,39	-15,13	9,56
RF5582	20K+ construto CBD Nº 1, CBHI-	1000	16,61	-9,76	23,98	-14,98	7,37
RF5582	20K+ construto CBD Nº 1, CBHI-	500	16,70	-9,93	22,75	-14,75	6,05
RF5583	20K+ construto CBD Nº 2, CBHI-	3000	16,73	-9,98	24,78	-14,95	8,05
RF5583	20K+ construto CBD Nº 2, CBHI-	1000	16,92	-9,92	22,73	-14,57	5,81
RF5583	20K+ construto CBD Nº 2, CBHI-	500	16,62	-10,03	21,76	-14,37	5,14
RF5977	20K +construto CBD Nº 5, <sup>2</sup>	500	16,56	-9,77	23,00	-14,55	6,45

L\* indica a claridade, -b\* indica a direção do azul, +b\* indica a direção do amarelo.

<sup>1</sup>Preparação comercial, <sup>2</sup>CBHI-, CBHI-, EGI-, EGI-

Resultados na Tabela 10 e figura 16 mostram que o desempenho da lavagem das proteínas de fusão CBD + 20K da invenção no tratamento de sarja de Nimes foi muito melhorado em comparação com as cepas 20K. Com a cepa RF5977, a dosagem enzimática tão baixa quanto 250 NCU/g de tecido pôde ser usada para obter um nível de abrasão similar (clareza L\*) àquele obtido com a dosagem de 20K de 1500 NCU/g. Assim, um desempenho de lavagem 6 vezes melhor foi obtido, e contraste foi bom. Também o desempenho de lavagem obtido com a cepa RF5978 foi semelhante àquele obtido com a cepa RF5977.

Tratamento com aquecimento das preparações da proteína de fusão aparentou até certo grau diminuir o efeito de lavagem em pedra, por exemplo, com a cepa RF5977 uma dosagem de 500 NCU/g de tecido foi necessária para obter o mesmo nível de abrasão que com a dosagem de 250 NCU/g da preparação enzimática não tratada por aquecimento (Tabela 10). Todavia, uma melhora de 3 vezes no desempenho de lavagem foi alcançada em comparação com uma preparação da técnica anterior.

**Exemplo 9. Desempenho das preparações de proteína mutante de afinidade CBD + 20K de fusão e de proteína de anulação do ligante CBD + 20K de fusão no acabamento/desbotamento de sarja de Nimes**

Enzimas mutantes de afinidade CBD + 20K de fusão produzidas usando *Trichoderma* como hospedeiro conforme descrito no Exemplo 4 foram testadas quanto à sua capacidade no desbotamento da sarja de Nimes. Uma preparação 20K eficiente no acabamento de sarja de Nimes foi usada por comparação.

A sarja de Nimes e os sistemas de teste para desbotamento foram como no Exemplo 8. Também o efeito do tratamento com celulase foi avaliado como no Exemplo 8. Os resultados do teste de desbotamento para a proteína mutante de afinidade CBD + 20K de fusão e as preparações de proteína de anulação de 20K + ligante CBD de fusão estão mostradas na Tabela 12.

A cepa RF6090 com a substituição no aminoácido Y31W mos-

5 trou um excelente desempenho de lavagem (cerca de 6 vezes melhor do que 20K) e um bom contraste. A eficiência da cepa RF6090 em comparação com 20K pode ser claramente vista também na figura 16. A cepa RF6084 com a substituição do aminoácido Y31A foi cerca de 1,5 vez melhor do que a

10 de 20K. As proteínas de fusão CBD + 20K<sub>mut</sub> com uma substituição de aminoácido Y32A ou Y31A\_Y32A tiveram um efeito de desbotamento mais baixo do que 20K. O desempenho de lavagem das proteínas de anulação 20K + ligante CBD no tratamento da sarja de Nimes foi muito melhorado em comparação com a cepa 20K e foi obtido um bom contraste, Com a cepa

10 RF6108 ( $\Delta$ G-444), o desempenho de lavagem foi pelo menos 6 vezes melhor do que com 20K e com a cepa RF6110 ( $\Delta$ G-460) cerca de 3 vezes melhor.

**Tabela 12. Medições de cor do lado da face de sarja de Nimes tratada com mutante de afinidade CBD + 20K e proteínas de anulação de ligante CBD + 20K de fusão**

Nº da Cepa	Enzima (substituição de aminoácido)	Atividade/ g de tecido	Antes do tratamento com celulase		Depois do tratamento com Celulase		Aumento de L*
			L*	B*	L*	B*	
-	Sem enzima	0	16,77	-9,95	18,18	-12,39	1,42
-	20K <sup>1</sup>	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
-	20K <sup>1</sup>	1500	16,73	-10,05	22,98	-14,62	6,25
RF6086	20K +CBDmut(Y32A)	1500	16,83	-9,68	22,05	-14,14	5,22
RF6086	20K +CBDmut(Y32A)	3000	16,68	-9,76	23,30	-14,40	6,62
RF6084	20K +CBDmut(Y31A)	1000	16,83	-9,42	23,15	-14,26	6,32
RF6090	20K +CBDmut(Y31W)	250	16,79	-9,32	22,99	-14,24	6,21
RF6090	20K +CBDmut(Y31W)	1000	16,77	-9,22	25,10	-14,74	8,33
RF6094	20K +CBDmut(Y31A_Y32A)	1500	16,78	-9,30	21,66	-14,02	4,89
RF6094	20K +CBDmut(Y31A_Y32A)	3000	16,71	-9,36	22,27	-14,14	5,56
-	20K <sup>1</sup>						
RF6108	CBD + 20K(ΔG-444)	3000	16,80	-9,70	24,00	-14,71	7,20
RF6110	CBD + 20K(ΔG-460)	250	16,65	-9,59	23,62	-13,97	6,97
RF6110	CBD + 20K(ΔG-460)	1000	16,81	-9,72	24,17	-14,39	7,37

L\* indica a claridade. -b\* é a direção do azul. +b\* é a direção do amarelo. <sup>1</sup>Preparação comercial

**Exemplo 10. Efeito nas proteínas de fusão CBD + 20K na força da sarja de Nimes**

5 Alguns dos jeans obtidos a partir dos testes de lavagem com proteínas de fusão CBD + 20K (Exemplos 8 e 9) que tiveram um nível de abrasão similar ( $L^*$  - valor cerca de 23 ou 24 depois do tratamento com celu-  
lase) foram selecionados pelas medições de força. A força de rasgo depois  
do tratamento com proteínas de fusão CBD + 20K e as amostras de controle  
foram medidas pelo método de Elmendorf de acordo com SFS-EN ISO  
13937-1 padrão. Os exemplares foram cortados tanto na direção da urdidura  
10 quanto na da trama. Os resultados estão mostrados na Tabela 13.

As proteínas de fusão da celulase causaram essencialmente a  
mesma perda de força ou menos que a 20K, isto é, com algumas prepara-  
ções a força do tecido permaneceu ainda maior. A mais baixa perda de força  
tanto na direção da urdidura quanto da trama foi obtida com a cepa RF6108  
15 com a anulação do ligante  $\Delta G-444$ . Também o mutante por afinidade  
RF6090 com a substituição do aminoácido Y31W causou uma menor perda  
de força do que a 20K. A cepa RF5977 teve um efeito antes similar na força  
do tecido do que 20K.

20 Alguns dos jeans lavados com preparações de proteína de fusão  
tratadas com aquecimento (Exemplo 8, Tabela 11) também foram seleciona-  
dos para medições de força de rasgo. Foi notado que a força do tecido foi  
melhorada com algumas preparações tratadas com aquecimento, mas devi-  
do ao desempenho de lavagem reduzido, dosagens mais altas tiveram que  
ser usadas para obter o mesmo nível de abrasão.

Tabela 13. Medições de força de rasgo de jeans tratado com proteínas de fusão CBD + 20K da invenção

Cepa No.	Proteína da enzima	NCU/g de tecido	L*	Urdidura		Trama	
				Força de rasgo (N)	(%)	Força de rasgo (N)	(%)
-	Sem enzima	0	1,5	62,2	100,0	46,2	100,0
-	20K <sup>1</sup>	1500	22,9	46,3	74,4	31,9	69,0
RF5977	20K +CBD	250	22,9	48,1	77,3	32,1	69,5
RF6086	20K +CBDmut (Y32A)	3000	23,1	46,6	74,9	30	64,9
RF6084	20K +CBDmut (Y31A)	1000	23,1	47,2	75,9	30,6	66,2
RF6090	20K +CBDmut (Y31W)	250	23,2	48,6	78,1	34,4	74,5
RF6094	20K +CBDmut (Y31A_Y32A)	3000	22,3	48,4	77,8	32,9	71,2
-	20K <sup>1</sup>	3000	23,9	47,6	76,5	28,9	62,6
RF6108	CBD + 20K ( $\Delta$ G-444)	250	23,8	54,3	87,3	35,2	76,2
RF6110	CBD + 20K ( $\Delta$ G-460)	1000	24,0	48,4	77,8	29,8	64,5

<sup>1</sup> Preparação comercial

**Exemplo 11. Comparação das preparações de proteína de fusão CBD + 20K selecionadas com as preparações enzimáticas da técnica anterior**

As melhores proteínas de fusão CBD + 20K dos Exemplos 8 e 9 foram testadas com outro tipo de sarja de Nimes. Preparação 20K (Ecostone® NP8500) eficiente no acabamento da sarja de Nimes e duas preparações da técnica anterior comercialmente disponíveis, Denimax® 399S da Novozymes e Mex500 da Meiji, a qual é a preparação enzimática sólida mais concentrada comercialmente disponível, foram usadas para comparação.

O sistema de teste para desbotamento foi como no Exemplo 8, exceto que a carga de sarja de Nimes foi de 1 Kg e a proporção de líquido, conseqüentemente, foi levemente maior. Cinco peças de sarja de Nimes ("pernas") feitas de sarja de Nimes Down Under (Bradmill Textiles Pty, Austrália) foram usadas para cada teste depois da desgomagem. Fios de urdidura e da trama do tecido foram transformados em fios de algodão torcido. As enzimas foram dosadas como unidades de dosagem - NCU, de forma que níveis de abrasão similares (medidos como claridade do lado da face de sarja de Nimes depois do tratamento com celulase) foram obtidos. O efeito do tratamento de celulase foi avaliado como no Exemplo 8, exceto 20 medições de cor foram medidas por perna.

Duas pernas com nível de abrasão semelhantes (valor L\* cerca de 26 depois do tratamento com celulase) de cada teste de lavagem foram selecionadas para as medições de força. A força de rasgo depois do tratamento com proteínas de fusão CBD + 20K e amostras de controle foram medidas como no Exemplo 10. Os resultados estão mostrados na Tabela 14 e nas figuras 17A e 17B.

A força de rasgo do tecido, a qual é tipicamente mais fraca do fio do que a urdidura, foi mais alta com as proteínas de fusão das cepas RF5977, RF6090, RF6108 e RF6110 do que com 20K. Com todas as cepas de proteína de fusão foi obtida uma força consideravelmente maior tanto na direção da urdidura quanto da trama em comparação com DeniMax 399S e Mex 500. Também a cepa 20K foi menos prejudicial à força no tecido do que

outras preparações da técnica anterior.

**Tabela 14. Medições de força de rasgo de sarja de Nimes tratada com proteínas de fusão CBD + 20 K da invenção, 20K e preparações da técnica anterior**

Enzima	Forma	L*	Urdidura Força de rasgo (N)	Trama Força de rasgo (N)
Ecostone NP8500	Pó	25,9	58,0	40,3
RF5977, 20K+CBD	Grânulo	26,0	56,1	44,4
Mex 500, Meiji	Pó	26,1	48,4	31,1
DeniMax 399S, Novozymes	Grânulo	25,5	50,6	38,1
RF6090, 20K+CBD <sub>mut</sub> (Y31W)	Líquido	26,0	57,9	43,4
RF6108, 20K+CBD ( $\Delta$ G-444)	Líquido	25,9	55,6	43,9
RF6110, 20K+CBD ( $\Delta$ G-460)	Líquido	26,2	59,8	45,4

L\* indica a claridade do lado da face da sarja de Nimes depois do tratamento com celulase

5 **Exemplo 12. Desempenho da preparação de CBD + 20K no bioacabamento (remoção de bolinhas)**

O desempenho da preparação de proteína de fusão CBD + 20K concentrada no bioacabamento foi testado. Uma preparação de celulase ácida enriquecida com EGII comercial (US 5.874.293) usada em formulações de bioacabamento e tratamento sem enzima foram usados por comparação. Os tratamentos de remoção de bolinhas foram efetuados com o extrator de lavagem Wascator FOM 71 CLS da Electrolux sob as condições descritas na Tabela 15.

15 Peças de dois tipos de pulôveres não-usados feitos de 1200% de algodão: tecido baseado em jérsei e rib com superfície flocosa foram usadas como material de teste com material de enchimento. Amostras foram pré-lavadas por 10 min a 60°C com 1 mL/L de tensoativos/agentes umidificantes (Sandoclean PCJ da Sandos e Imacol CN da Clariant) e enxaguadas 3 vezes. Depois disso, os tecidos de malha foram tratados com celulase a 20 60°C por 60 minutos na presença dos mesmos adjuvantes têxteis que os usados na pré-lavagem. Depois da drenagem, a enzima foi inativada (por 10 min a 60°C) pela elevação do pH acima de 11 com hidróxido de sódio. As peças de roupa de malha foram, então, enxaguadas três vezes e secas em

um tambor secador de roupas.

**Tabela 15. As condições/parâmetros de processo de teste usados nos tratamentos de bioacabamento**

Parâmetro do processo	
Carga de tecido	1,0 Kg
Água	15 litros
Sandoclean PCJ e Imacol CN	1 mL/L
Controle de pH pH 5-5,3/pH 6-6,3	Ajuste com ácido acético (80 %)
Tempo	60 min
Temperatura	60°C
Dosagem de celulase	0,25 % a 0,63% do peso do tecido

O efeito do tratamento de celulase foi avaliado visualmente a  
 5 olho nu e com uma lupa. Os resultados estão mostrados na Tabela 16 e fo-  
 tos de câmera digital tomadas com uma macroobjetiva estão mostradas na  
 figura 18.

A preparação de proteína de fusão CBD + 20K teve excelentes  
 propriedades de bioacabamento levando a uma redução extensiva na floco-  
 10 sidade e na prevenção da formação de bolinhas que possam ser claramente  
 vistas a partir das fotos (tomadas das amostras de rib) na figura 18. As a-  
 mostras de controle, especialmente de pulôver rib, tratadas sem enzima,  
 continham uma flocosidade de superfície densa e formação de bolinhas se-  
 vera. Com a preparação CBD + 20K, uma superfície muito limpa da roupa  
 15 de malha foi obtida já com a menor dosagem (0,25% do peso do tecido,  
 o.w.f.), correspondendo a uma atividade de celulase neutra de 125 NCU/g  
 de tecido. Essa dosagem resultou em um efeito quase tão bom quanto uma  
 dosagem de duas vezes. Usando uma dosagem de 0,5% de preparação  
 CBD + 20K do peso do tecido, um efeito de remoção de bolinhas semelhan-  
 20 te foi obtido em comparação com o uso de uma dosagem de 0,63% o.w.f. de  
 preparação enriquecida com EG II, que foi usada em uma dosagem típica  
 para esse concentrado de enzima na aplicação do bioacabamento. Também  
 o meio de cultura do CBD + 20K produzido pelo hospedeiro recombinante é  
 volumetricamente pelo menos duas vezes tão eficaz no bioacabamento do  
 25 que aquele de EG II produzido por um hospedeiro recombinante.

**Tabela 16. Os resultados dos tratamentos de bioacabamento com proteína de fusão CBD + 20K em comparação com EGII enriquecido e controle sem enzima**

Amostra	Dosagem g	Dosagem, % o.w.f <sup>a)</sup>	Efeito de remoção de formação de bolinhas <sup>b)</sup>
20K+CBD conc.	5	0,50	+++++
20K+CBD conc.	2,5	0,25	++++
EGII enriquecido conc.	6,3	0,63	+++++
Controle, sem enzima	-	-	-

<sup>a)</sup> do peso do tecido

<sup>b)</sup> +++++ Excelente efeito de remoção de bolinhas, superfície visualmente muito limpa.

++++ Efeito de remoção de bolinhas muito bom, superfície visualmente limpa.

- Flocosidade de superfície densa e/ou formação de bolinhas severo.

### 5 Exemplo 13. Desempenho da preparação CBD + 20K na aplicação de detergente

A eficiência de uma preparação de proteína de fusão CBD + 20K granulada foi testada com ciclos de lavagem repetidos em uma máquina doméstica usando enzima de 0 até 0,5% de peso de formulação detergente (detergente padrão ECE 98), a qual não continha quaisquer enzimas. As condições de teste estão descritas na Tabela 17. Carga, dosagem de detergente e as principais condições de teste foram de acordo com o padrão EN 60456:2003, mas com sujeiras adicionais. As amostras de tecido foram tomadas depois de 5, 10 e 15 lavagens.

### 15 Tabela 17. Projeto do teste para testar o desempenho da preparação CBD + 20K

Item	Especificação
Concentração de enzima em uso	0, 0,1, 0,25, 0,5 %
Máquina de lavar	Siemens 1632 IQ
Programa de lavagem	Programa de algodão padrão sem lógica flocosa
Detergente	ECE 98, 50 g por lavagem
pH do detergente no líquido de lavagem	11
Temperatura de lavagem	40/60°C
Dureza da água	16°fH
Carga	IEC60456:2003 carga de 4 Kg
Mancha artificial adicionada Total de 38 peças (37 x 37cm) de cada tipo	Art. No. 101*, algodão sujo com negro de carbono / óleo de oliva Art. No. 163*, algodão sujo com mingau de cereal Art. No. 112*, algodão sujo com manteiga
Tecido de teste	Antiincinzentamento no Art. No. 224* Força de tensão no Art. No. 224*

\* da EMPA Test materialen AG, Suíça

Os resultados de teste no antiacinzentamento, executado no artigo 224 (ISO 2267) e medido como diferenças de igualdade de cor, estão mostrados nas Tabelas 18 e 19 e nas Figuras 19 e 20. A diferença de cor foi medida pelo método de três estímulos usando um colorímetro Spectraflash 500 (illuminant D65/10°).

A preparação de proteína de fusão CBD + 20K mostrou um efeito positivo no valor de cor de três estímulos Y e, conseqüentemente, no antiacinzentamento. O efeito de diferentes concentrações enzimáticas foi aproximadamente o mesmo. Já uma concentração de enzima muito baixa (0,10%) foi suficiente para o antiacinzentamento. Antes efeitos similares (dados não mostrados) foram obtidos com a proteína de fusão CBD + 20K em comparação com a celulase detergente comercial BIOTOUCH®DCC contendo 1,8 vez mais atividade celulase neutra (NCU).

Artigo 224 também foi usado para medições de força elástica (dados não mostrados) efetuadas de acordo com ISO 13934-1:1999 depois de 15 lavagens. Nenhuma das concentrações enzimáticas teve um efeito danoso na força elástica. Todos os resultados estavam dentro do desvio um do outro (variação de  $\pm 2,5\%$ ). O mesmo foi aplicado ao alongamento para quebrar a carga.

**Tabela 18. Desempenho da proteína de fusão CBD + 20K na aplicação detergente. Diferença de igualdade de cor entre o artigo 224 antiacinzentamento lavado com enzima e o artigo original (não-lavado).**

Temperatura de lavagem, conc. enzimática. (%)	Diferença (deltaY)		
	Depois de 5 lavagens	Depois de 10 lavagens	Depois de 15 lavagens
40°C, 0%	-7,46	-10,39	-12,30
40°C, 0,10%	-5,78	-6,60	-8,01
40°C, 0,25%	-5,52	-6,08	-8,18
40°C, 0,50%	-4,85	-5,24	-7,56
60°C, 0%	-8,65	-11,43	-13,95
60°C, 0,10%	-5,77	-6,77	-8,41
60°C, 0,250%	-4,72	-5,70	-7,46
60°C, 0,50%	-4,33	-6,29	-7,44

**Tabela 19. Desempenho da proteína de fusão CBD + 20K na aplicação detergente. Diferença de igualdade de cor entre o artigo 224 anti-tiacinzentamento lavado com enzima e a lavagem sem enzima.**

Temperatura de lavagem, concentração enzimática (%)	Diferença (deltaY)		
	Depois de 5 lavagens	Depois de 10 lavagens	Depois de 15 lavagens
40°C, 0%	0	0	0
40°C, 0,10%	1,68	3,79	4,29
40°C, 0,25%	1,94	4,31	4,12
40°C, 0,50%	2,61	5,15	4,74
60°C, 0%	0	0	0
60°C, 0,10%	2,88	4,66	5,54
60°C, 0,250%	3,93	5,73	6,49
60°C, 0,50%	4,32	5,14	6,51

## REFERÊNCIAS

- Aho S, V Oikkonen, T Jalava, M Paloheimo, R Buhler, M-L Niku-Paavola, EH Bamford e M Korhola. 1991. Monoclonal antibodies against core and cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases I and II and endoglucanase I. Eur. J. Biochem. 200:643-649.
- 5 Azevedo Mde O, Felipe MS, Astolfi-Filho S, Radford A. 1990. Cloning, sequencing and homologies of the cbh-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. J Gen Microbiol. 136: 2569-2576.
- Bailey MJ and Nevalainen KMH. 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. Enz Microbiol Technol. 3: 153-157.
- 10 Haakana H, Miettinen-Oinonen A, Joutsjoki V, Mäntylä A, Suominen P, and Vehmaanperä J. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. Enz Microbiol Technol. 34: 159-167.
- 15 Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309-316.
- Henrissat B. e Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 293: 781-788.
- 20 Hong J, Tamaki H, Yamamoto K and Kumagai H. 2003. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. Appl Microbiol Biotechnol 63: 42-50.
- Joutsjoki VV, Torkkeli TK, and Nevalainen KMH. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (*gamP*) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. 24:223-228.
- 25 Karhunen T, A Mäntylä, KMH Nevalainen, and PL Suominen. 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.
- 30 Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680 – 685.

- Linder M, Mattinen ML, Kontteli M, Lindéberg G, Ståhlberg J, Drakenberg T, Reinikainen T, Pettersson G, Annala A. 1995. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Science* 4: 1056-1064.
- 5           Lowry OH, NJ Roseborough, AL Farr and RJ Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-275.
- Malardier L, Daboussi MJ , Julien J, Roussel F, Scazzocchio C and Brygoo Y. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene*  
10   15:147-156.
- Miettinen-Oinonen A, Londesborough J, Joutsjoki V, Lantto R e Vehmaanperä, J. 2004. Three cellulases from *Melanoaropus albomyces* with applications in the textile industry. *Enz Microbiol Technol.* 34: 332-341.
- Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen, and J Knowles.  
15   1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61:155-164.
- Saloheimo A, Henrissat B, Hoffren AM, Teleman O, Penttilä M. 1994. A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol Microbiol* 13: 219-228.
- 20           Sambrook J, EF Fritsch, e T Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.
- Sambrook J e DW Russell. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.
- Srisodsuk M, Reinikainen T, Penttilä M, Teeri TT. 1993. Role of  
25   the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.* 268: 20756-20761.
- Van Tilbeurgh H, Loonties F, de Bruyne C, Clayssens M 1988. Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Meth. Enzymol.* 160: 45-59.
- 30           Ward M, Shan W, Dauberman J, Weiss G, Larenas E, Bower B, Rey M, Clarkson K e Bott R. (1993) Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pI endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma*

reesei. Proceedings of the second TRICEL symposium on *TRICHODERMA REESEI* CELLULASES AND OTHER HYDROLASES, Espoo, Finland, 1993, ed. by P. Suominen and T. Reinikainen. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8 (1993): 153-158.

## LISTAGEM de SEQUÊNCIAS

<110> AB Enzymes Oy

<120> Celulases melhoradas

<130> 2050016

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 936

<212> DNA

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 1

tcgcccctaa ccgagaacca aagactccaa gaatgcgctc tactcccgtt ctccgcgccc 60

tcttgcccgc agcattgccc ctcggggccc tcgccgcaa cggtcagtcc acgaggtaac 120

tgatcacccg cctcattacg cgtgccgacc ggaccgcgtt cagggctcac tgctcaccgc 180

atccagatac tgggactgct gcaagccgctc gtgcggctgg gccggaaagg gccccgtgaa 240

ccagcccgtc tactcgtgcg acgccaactt ccagcgcac cagcacttcg atgccgtctc 300

gggctgcgag gggggccccg ctttctcgtg cgccgaccac agcccctggg ccattaatga 360

caacctctcg tacggcttcg cggcgactgc actcagcggc cagaccgagg agtcgtggtg 420

ctgtgcctgc tacgcgtgag tgtgcttggg cccaacgtcg gtgattccgg agttcagacc 480

actgaccag cgaccgctc gccagtctga cttttacac ggggtcccgtg gccggcaaga 540

ccatggctgt ccagtcgacc agcacgggcg gcgacctcg cagcaaccac ttcgacctca 600

acatccccgg cggcggcgctc ggcctcttcg acggctgcac tcccagttc ggcggcctcc 660

cgggcgcaag gtacggcggc atctcgtcgc gccaggagtg cgactcgttc cccgagccgc 720

tcaagcccgg ctgccagtgg cgcttcgact ggttccagaa cgccgacaac ccgtccttta 780

ccttcgagcg ggtccagtgc cccgaggagc tggtcgctcg gaccggctgc aggcgccacg 840

acgacggcgg cttcgccgctc ttcaaggccc ccagcgcctg atccgttttt gggcagtgtc 900

cgtgtgacgg cagctacgtg gaacgacctg gagctc 936

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Melanocarpus albomyces

&lt;400&gt; 2

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Val  
195 200 205

Phe Lys Ala Pro Ser Ala  
210

<210> 3  
<211> 1820  
<212> DNA  
<213> *Trichoderma reesei*

<400> 3  
ccgcggtactg cgcatcatgt atcggaagtt ggcggtcatc tcggccttct tggccacagc 60  
tcgtgctcag tcggcctgca ctctccaatc ggagactcac ccgcctctga catggcagaa 120  
atgctcgtct ggtggcactt gcaactcaaca gacaggctcc gtgggtcatcg acgccaactg 180  
gcgctggact cagcgtacga acagcagcac gaactgctac gatggcaaca cttggagctc 240  
gaccctatgt cctgacaacg agacctgctc gaagaactgc tgtctggagc gtgccgccta 300  
cgcgctccag tacggagtta ccacgagcgg taacagcctc tccattggct ttgtcaccca 360  
gtctgcgcag aagaacgctg gcgctcgcct ttaccttatg ggcagcgaca cgacctacca 420  
ggaattcacc ctgcttgcca acgagttctc tttcgatggt gatgtttcgc agctgccgta 480  
agtgacttac catgaacccc tgacgtatct tcttgtgggc tccagctga ctggccaatt 540  
taaggctcgg cttgaacgga gctctctact tcgtgtccat ggacgcggat ggtggcgtga 600  
gcaagtatcc caccaacacc gctggcgcca agtacggcac ggggtactgt gacagccagt 660  
gtccccgga tctgaagttc atcaatggcc aggccaacgt tgagggctgg gagccgtcat 720  
ccaacaacgc aaacacgggc attggaggac acggaagctg ctgctctgag atggatatct 780  
gggaggccaa ctccatctcc gaggctctta cccccaccc ttgcacgact gtcggccagg 840  
agatctgcga ggggtgatggg tgcggcgga cttactccga taacagatat ggcggcactt 900  
gcgatcccga tggctgcgac tggaacccat accgcctggg caacaccagc ttctacggcc 960  
ctggetcaag cttaccctc gataccacca agaaattgac cgttgtcacc cagtccgaga 1020  
cgtcgggtgc catcaaccga tactatgtcc agaatggcgt cactttccag cagcccaacg 1080  
ccgagcttgg tagttactct ggcaacgagc tcaacgatga ttactgcaca gctgaggagg 1140  
cagaattcgg cggatcctct ttctcagaca agggcggcct gactcagttc aagaaggcta 1200  
cctctggcgg catggttctg gtcattgagc tgtgggatga tgtgagttg atggacaaac 1260  
atgcgcgctg acaaagagtc aagcagctga ctgagatgtt acagtactac gccaacatgc 1320  
tgtggtgga ctccacctac ccgacaaaacg agacctctc cacaccgggt gccgtgcgcg 1380  
gaagctgctc caccagctcc ggtgtccctg ctgaggtcga atctcagtct cccaacgcca 1440  
aggtcacctt ctccaacatc aagttcggac ccattggcag caccggcaac cctagcggcg 1500  
gcaaccctcc cggcggaaac ccgcctggca ccaccaccac ccgccgcca gccactacca 1560

ctggaagctc tcccggacct acccagtctc actacggcca gtgcggcggg attggctaca 1620  
 gcgggcccccac ggtctgcgcc agcggcaciaa cttgccaggt cctgaaccct tactactctc 1680  
 agtgccctgta aagctccgtg cgaaagcctg acgcaccggg agattcttgg tgagcccgta 1740  
 tcatgacggc ggcgggagct acatggcccc gggtgattta ttttttttgt atctacttct 1800  
 gacccttttc aaatatacgg 1820

<210> 4

<211> 497

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 4

Gln Ser Ala Cys Thr Leu Gln Ser Glu Thr His Pro Pro Leu Thr Trp  
 1 5 10 15

Gln Lys Cys Ser Ser Gly Gly Thr Cys Thr Gln Gln Thr Gly Ser Val  
 20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Ala Thr Asn Ser Ser Thr  
 35 40 45

Asn Cys Tyr Asp Gly Asn Thr Trp Ser Ser Thr Leu Cys Pro Asp Asn  
 50 55 60

Glu Thr Cys Ala Lys Asn Cys Cys Leu Asp Gly Ala Ala Tyr Ala Ser  
 65 70 75 80

Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ser Leu Ser Ile Gly Phe Val  
 85 90 95

Thr Gln Ser Ala Gln Lys Asn Val Gly Ala Arg Leu Tyr Leu Met Gly  
 100 105 110

Ser Asp Thr Thr Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Leu Gly Asn Glu Phe Ser  
 115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Gln Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu  
 130 135 140

Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Val Ser Lys Tyr Pro Thr  
 145 150 155 160

Asn Thr Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys  
 165 170 175

Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp  
 180 185 190

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile Gly Gly His Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Glu Ala  
 210 215 220

Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu Ile Cys Glu Gly  
 225 230 235 240

Asp Gly Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Arg Tyr Gly Gly Thr Cys  
 245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu Gly Asn Thr Ser  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr Thr Lys Lys Leu  
 275 280 285

Thr Val Val Thr Gln Ser Glu Thr Ser Gly Ala Ile Asn Arg Tyr Tyr  
 290 295 300

Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala Glu Leu Gly Ser  
 305 310 315 320

Tyr Ser Gly Asn Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Cys Thr Ala Glu Glu Ala  
 325 330 335

Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly Leu Thr Gln Phe  
 340 345 350

Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp  
 355 360 365

Asp Tyr Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn  
 370 375 380

Glu Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Gly Ser Cys Ser Thr Ser  
 385 390 395 400

Ser Gly Val Pro Ala Gln Val Glu Ser Gln Ser Pro Asn Ala Lys Val  
 405 410 415

Thr Phe Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn Pro  
 420 425 430

Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr Thr  
 435 440 445

Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser  
 450 455 460

His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys  
 465 470 475 480

Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys  
 485 490 495

Leu

<210> 5  
 <211> 1895  
 <212> DNA  
 <213> *Melanocarpus albomyces*

<400> 5  
 gaattcgggg gttgccaggg agtcgtacag ggggtgggtgg aggggggatgg gggatggaag 60  
 ggggatggag aagaaagcat atatgggacg tttgtgctcg ccggtcccc tctgccacgt 120  
 tcccttgctt ccttgectgg gttgttggtg gtcttccctt caccatccga caaaccaacc 180  
 tgctgcgggt gaactgcgag agcgccttcg gacgacgaca gacagacgca ccatgactcg 240  
 caacatcgcc ctgctcggcg ccgcgtcggc gtcctggggc ctgcccacg gccagaagcc 300  
 gggcgagacg cccgaggtgc accgcgagct gacgacgttc cgggtgcacca aggcggacgg 360  
 gtgccagccg cggaccaact acattgtgct ggactcgctg tcgcacccgg tgcaccaggt 420  
 ggacaacgac tacaactgcg gcgactgggg gcagaagccc aacgcgacgg cgtgcccgga 480  
 cgtcgagtcg tgcgcgcgca actgcatcat ggagggcgtg cccgactaca gccagcacgg 540  
 cgtcacgacg agcgacacgt cgctgcgcct gcagcagctc gtcgacggcc gcctcgtcac 600  
 gccgcgcgtc tacctgctcg acgagaccga gcaccgctac gagatgatgc acctgaccgg 660  
 ccaggagttc acctttgagg tcgacgccac caagctgccc tgccggcatga acagcgcctt 720  
 ctacctgtcc gagatggacc cgaccggcgc ccggagcgag ctcaaccccg gcggtgccta 780  
 ctacggcacc ggctactgcg acgcccagtg cttcgtgacg ccattcatca acggcattgt 840  
 gagtgttccc ctttgcccc ccccctgaaa atagatgtac ctgggtgcta accccggggt 900  
 gtcgcaccaa aacagggcaa catcgagggc aagggctcgt gctgcaacga gatggacatc 960  
 tgggagggca actcgcgggc gacgcacgtg gcgccgaca cgtgcaacca gacgggtctg 1020  
 tacatgtgcg agggcgccga gtgcgagtac gacggcgtgt gcgacaagga cgggtgctgg 1080  
 tggaaccctg accgggtcaa catcaccgac tactacggca actcggacgc gttccgcgtc 1140  
 gacacgcggc ggcccttcac cgtggtgacg cagttcccgg ccgacgccga gggccggctc 1200



Glu Val Asp Ala Thr Lys Leu Pro Cys Gly Met Asn Ser Ala Leu Tyr  
 130 135 140

Leu Ser Glu Met Asp Pro Thr Gly Ala Arg Ser Glu Leu Asn Pro Gly  
 145 150 155 160

Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Phe Val Thr  
 165 170 175

Pro Phe Ile Asn Gly Ile Gly Asn Ile Glu Gly Lys Gly Ser Cys Cys  
 180 185 190

Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Arg Ala Thr His Val Ala  
 195 200 205

Pro His Thr Cys Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Met Cys Glu Gly Ala Glu  
 210 215 220

Cys Glu Tyr Asp Gly Val Cys Asp Lys Asp Gly Cys Gly Trp Asn Pro  
 225 230 235 240

Tyr Arg Val Asn Ile Thr Asp Tyr Tyr Gly Asn Ser Asp Ala Phe Arg  
 245 250 255

Val Asp Thr Arg Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Pro Ala Asp  
 260 265 270

Ala Glu Gly Arg Leu Glu Ser Ile His Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly  
 275 280 285

Lys Val Ile Glu Ser Tyr Val Val Asp Ala Pro Gly Leu Pro Arg Thr  
 290 295 300

Asp Ser Leu Asn Asp Glu Phe Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Arg Tyr  
 305 310 315 320

Leu Asp Leu Gly Gly Thr Ala Gly Met Gly Asp Ala Met Thr Arg Gly  
 325 330 335

Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe Met Asn  
 340 345 350

Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ala Gly Pro Cys Leu Pro Asp Glu Gly Asp  
 355 360 365

Pro Lys Asn Ile Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Glu Val Thr Tyr Ser  
 370 375 380

Asn Leu Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser Thr Phe Glu Ala Glu Ser Asp  
 385 390 395 400

Asp Asp Gly Asp Gly Asp Asp Cys  
405

<210> 7

<211> 2100

<212> DNA

<213> *Melanocarpus albomyces*

<400> 7

cccggctctgg agacggggag cgcgccagcg acgcaggata agaaggcgac gaccgcgcct 60  
 ccgagccagg cccaggacag caggagaact cgccacgcgc aagcagcacg cccgatcgac 120  
 agtgtcccgc tctgcccaca gcaactctgca accatgatga tgaagcagta cctccagtac 180  
 ctcgcgcccg cgctgcccgt cgctggcctc gccgccggcc agcgcgctgg taacgagacg 240  
 cccgagaacc accccccgct cacctggcag aggtgcacgg ccccgggcaa ctgccagacc 300  
 gtgaacgccg aggtcgtcat tgacgccaac tggcgctggc tgcacgacga caacatgcag 360  
 aactgctacg acggcaacca gtggaccaac gcctgcagca ccgccaccga ctgctgctgag 420  
 aagtgcattg tcgaggggtg cggcgactac ctggggcacct acgggcgctc gaccagcggc 480  
 gacgccctga cgctcaagtt cgtcaccaag cacgagtacg gcaccaacgt cggctcgcgc 540  
 ttctacctca tgaacggccc ggacaagtac cagatgttca acctcatggg caacgagctt 600  
 gcctttgacg tcgacctctc gaccgtcgag tgcggcatca acagcgcctt gtacttctgc 660  
 gccatggagg aggacggcgg catggccagc taccggagca accaggcccg cgccccgtac 720  
 ggcactgggg tgagttgagc tccgctttgt ttcgagtcgc aacgaggcac tttctgggcg 780  
 ccggctaact ctctcgattc ctccgacagt actgcgatgc ccaatgcgct cgtgatetca 840  
 agttcgttgg cggcaaggcc aacattgagg gctggaagtc gtccaccagc gacccaacg 900  
 ctggcgtcgg cccgtacggc agctgctcgc ctgagatcga cgtctggtga gtgagagacc 960  
 gtccaccagc gttcggatgc ggggtggaaa tttcgcggct aacggagcac cccccagga 1020  
 gtcgaatgcc tatgccttcg ctttcacgcc gcacgcgtgc acgaccaacg agtaccacgt 1080  
 ctgagagacc accaactcgc gtggcaccta ctcgaggac cgcttcgccg gcaagtgcga 1140  
 cgccaacggc tgcgactaca acccctaccg catgggcaac cccgacttct acggcaaggg 1200  
 caagacgctc gacaccagcc gcaagttcac gtgcgtgacc cttgtggcg caacctttct 1260  
 ctgcctgcct ggacacactg aaactgacac gtcgttttcg gctgcagcgt cgtctcccgc 1320  
 ttcgaggaga acaagctctc ccagtacttc atccaggacg gccgcaagat cgagatcccg 1380  
 ccgccgacgt gggagggcat gcccaacagc agcgagatca cccccgagct ctgtccacc 1440  
 atgttcgatg tgttcaacga ccgcaaccgc ttcgaggagg tcggcggtt cgagcagctg 1500  
 aacaacgccc tccgggttcc catggtcctc gtcattgcca tctgggacga cgtaagtacc 1560

cgccgacctc cctàgcccaca caagccgcat ccggcgaggc acgccatcgc tgctgctaac 1620  
acgagaccgt tcgtagcact acgccaacat gctctggctc gactocatct acccgcccga 1680  
gaaggagggc cagcccggcg ccgcccgtgg cgactgcccc acggactcgg gtgtccccgc 1740  
cgaggtcgag gctcagttcc ccgacgcgta agacttgccc ccgaccccaa gcttccactt 1800  
ctggatgccg aatgctaaca cgcgaaacag ccaggctcgtc tggccaaca tccgcttcgg 1860  
ccccatcggc tcgacctagc acttctaagc cggctcatgc actcgcagcc ctggggcccg 1920  
cacgcccggc acctcccctc gcggaaactc tccgtgcgtc gcgggctcca aagcattttg 1980  
gcctcaagtt tttttcgttc atgtttcagt tctttccgca tgtatcctaa gctccgatag 2040  
caagagaaat tgccagtctg agttttggga acctgtgatc cacatcatgg acgcataatg 2100

<210> 8

<211> 430

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 8

Gln Arg Ala Gly Asn Glu Thr Pro Glu Asn His Pro Pro Leu Thr Trp  
1 5 10 15

Gln Arg Cys Thr Ala Pro Gly Asn Cys Gln Thr Val Asn Ala Glu Val  
20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Asp Asp Asn Met Gln Asn  
35 40 45

Cys Tyr Asp Gly Asn Gln Trp Thr Asn Ala Cys Ser Thr Ala Thr Asp  
50 55 60

Cys Ala Glu Lys Cys Met Ile Glu Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Gly Thr  
65 70 75 80

Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ala Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr  
85 90 95

Lys His Glu Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Asn  
100 105 110

Gly Pro Asp Lys Tyr Gln Met Phe Asn Leu Met Gly Asn Glu Leu Ala  
115 120 125

Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Val Glu Cys Gly Ile Asn Ser Ala Leu  
130 135 140

Tyr Phe Val Ala Met Glu Glu Asp Gly Gly Met Ala Ser Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160

Asn Gln Ala Gly Ala Arg Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175

Ala Arg Asp Leu Lys Phe Val Gly Gly Lys Ala Asn Ile Glu Gly Trp  
 180 185 190

Lys Ser Ser Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Pro Tyr Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ala Glu Ile Asp Val Trp Glu Ser Asn Ala Tyr Ala Phe Ala  
 210 220

Phe Thr Pro His Ala Cys Thr Thr Asn Glu Tyr His Val Cys Glu Thr  
 225 230 235 240

Thr Asn Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Glu Asp Arg Phe Ala Gly Lys Cys  
 245 250 255

Asp Ala Asn Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Tyr Arg Met Gly Asn Pro Asp  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Lys Gly Lys Thr Leu Asp Thr Ser Arg Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Ser Arg Phe Glu Glu Asn Lys Leu Ser Gln Tyr Phe Ile Gln Asp  
 290 295 300

Gly Arg Lys Ile Glu Ile Pro Pro Pro Thr Trp Glu Gly Met Pro Asn  
 305 310 315 320

Ser Ser Glu Ile Thr Pro Glu Leu Cys Ser Thr Met Phe Asp Val Phe  
 325 330 335

Asn Asp Arg Asn Arg Phe Glu Glu Val Gly Gly Phe Glu Gln Leu Asn  
 340 345 350

Asn Ala Leu Arg Val Pro Met Val Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp  
 355 360 365

His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Pro Pro Glu Lys  
 370 375 380

Glu Gly Gln Pro Gly Ala Ala Arg Gly Asp Cys Pro Thr Asp Ser Gly  
 385 390 395 400

Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Gln Phe Pro Asp Ala Gln Val Val Trp  
 405 410 415

Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Tyr Asp Phe  
 420 425 430

<210> 9  
 <211> 3459  
 <212> DNA  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 9  
 gaattctaga cttttatcct ttcattccgac cagacttccc tttttgacct tggcgccctg 60  
 ttgactacct acctacctag gtagtaacgt cgctcgaccct cttgaatgat cttgtgcaca 120  
 ctgcaaacat ccgaaaacat acggcaaaag atgattgggc atggatgcag gagacatcga 180  
 atgagggcct agaaggaaat gaaaacctgg gaccaggacg ctaggtacga tgaatccgc 240  
 caatggtgaa actttaagtc gtgcctacag cacaggctct gtgaagattg cgctgttcag 300  
 acttaatctt ctcatcacag tccaagtctt tatgaaaagg aaaaagagag ggaagagcgc 360  
 tatttcgagc tgttggcctc ataggagac agtcgagcat accagcggta tcgacgtag 420  
 actcaaccaa gaataatgac gagaataaac acagaagtca accttgaact ggatagcagg 480  
 gttccagcag cagatagtta cttgcataaa gacaactccc cgagggctct ctgcatacac 540  
 caggatgttc cggaattatt cactgctcgt ttccgacgtg gcgtcagtga tccgtctcca 600  
 cagaactcta cctgggaata acccagggga ggaatctgca agtaagaact taataccaat 660  
 ccccggggct gccgaggtga atcgaatctc ccgcgggaaa ttaaaccat acgatgtttt 720  
 tgcaccacat gcatgcttag cacgatttct ccgcaaggga gtcacagaga aagacatatt 780  
 tcgcatacta ctgtgactct gcagagttac atatcactca ggatacattg cagatcattg 840  
 tccgggcac caaaatggac ctgcaggatc aacggcccga caaacacaa gtggctaaag 900  
 ctgggggatg cccgaaacc tctggtgcaa tatcatttga tggatgttcc ccccgattt 960  
 ctaagacatc gacggatcgg cccgcatact aatcctttta tcaacaaaa gttccactcg 1020  
 actagagaaa aaaaaggcca aggccactag ttgcagtcgg atactggtct tttcgccgctc 1080  
 caacaccttc atccatgatc cccttagcca ccaatgcccc acataatata tgttgacata 1140  
 ggtacgtagc tctgttatcc aatcggatcc gaacctcttt aacggacccc tcttacacac 1200  
 cttatcctaa cttcagaaga ctgttgccca ttggggattg aggaggtccg ggtcgcagga 1260  
 tgcgttctag gctaaattct cggccggtag ccatctogaa tctctcgtga agccttcac 1320  
 tgaacgggtg gcggcccgtc aagccgatga ccatgggttc ctgatagagc ttgtgcctga 1380  
 ccggccttgg cggcatagac gagctgaaca catcaggat gaacagatca gatataaagt 1440  
 cggattgagt cctagtagc agcaatccgc caccacaaa tcaagcaacg agcgacacga 1500  
 ataacaatat caatcgaatc gcaatgtatc agcgcgctct tctcttctct ttcttctctg 1560

ccgccgccc	cgcgcaagag	gccggtaccg	taaccgcaga	gaatcacct	tcctgacct	1620
ggcagcaatg	ctccagcggc	ggtagttgta	ccacgcagaa	tggaaaagtc	gttatcgatg	1680
cgaactggcg	ttgggtccat	accacctctg	gatacaccaa	ctgctacacg	ggcaatacgt	1740
gggacaccag	tatctgtccc	gacgacgtga	cctgcgctca	gaattgtgcc	ttggatggag	1800
cggattacag	tggcacctat	ggtgttacga	ccagtggcaa	cgccctgaga	ctgaactttg	1860
tcacccaaag	ctcaggaag	aacattggct	cgcgctgta	cctgctgcag	gacgacacca	1920
cttatcagat	cttcaagctg	ctgggtcagg	agtttacctt	cgatgtcgac	gtctccaatc	1980
tcccttgcg	gctgaacggc	gccctctact	ttgtggccat	ggacgccgac	ggcaattttg	2040
ccaaataccc	tggcaacaag	gcaggcgcta	agtatggcac	tggttactgc	gactctcagt	2100
gccctcggga	tctcaagttc	atcaacggtc	aggtacgtca	gaagtgataa	ctagccagca	2160
gagcccatga	atcattaact	aacgctgtca	aatacaggcc	aacgttgaag	gctggcagcc	2220
gtctgccaac	gacccaaatg	ccggcgttgg	taaccacggt	tctcgtgcg	ctgagatgga	2280
tgtctgggaa	gccaacagca	tctctactgc	ggtgacgcct	cacccatgcg	acacccccgg	2340
ccagaccatg	tgccagggag	acgactgtgg	tggaacctac	tctccactc	gatatgctgg	2400
tacctgcgac	cctgatggct	gcgacttcaa	tccttaccag	ccaggcaacc	actcgttcta	2460
cggccccggg	aagatcgctg	acactagctc	caaattcacc	gtcgtcacc	agttcatcac	2520
cgacgacggg	acaccctccg	gcaccctgac	ggagatcaaa	cgcttctacg	tccagaacgg	2580
caaggatgac	ccccagtcgg	agtcgacgat	cagcggcgtc	accggcaact	caatcaccac	2640
cgagtattgc	acggcccaga	aggcagcctt	cggcgacaac	accggcttct	tcacgcacgg	2700
cgggcttcag	aagatcagtc	aggctctggc	tcagggcgatg	gtcctcgtca	tgagcctgtg	2760
ggacgatcac	gccgccaaca	tgctctggct	ggacagcacc	taccgactg	atgaggacc	2820
ggacaccct	ggcgtcgcgc	gcggtacctg	ccccacgacc	tccggcgtcc	cggccgacgt	2880
tgagtcgcag	aacccaatt	catatgttat	ctactccaac	atcaaggctc	gacccatcaa	2940
ctcgaccttc	accgccaact	aagtaagtaa	cgggcactct	accaccgaga	gcttcgtgaa	3000
gatacagggg	tagttgggag	attgtcgtgt	acaggggaca	tgcgatgctc	aaaaatctac	3060
atcagtttgc	caattgaacc	atgaagaaaa	gggggagatc	aaagaagtct	gtcagaagag	3120
aggggctgtg	gcagcttaag	ccttgttgta	gatcgttcag	agaaaaaaaa	agtttgctga	3180
cttattatat	taggtcgatc	attatccgat	tgactccgtg	acaagaatta	aaaagagtac	3240
tgcttgcttg	cctatttaaa	ttgttatata	cgccgtagcg	cttgccgacc	accctcaca	3300
gtatatecgt	tcgcctcttc	ttgtctcttc	atctcacatc	acaggtccag	gtccagccc	3360
gcccgtccg	ggtgccatgc	atgcacaggg	ggactaatat	attaatcgtg	accctgtvcc	3420
taagctaggg	tcctgcatt	ttgaacctgt	ggacgtctg			3459

<210> 10  
 <211> 440  
 <212> PRT  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 10  
 Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr Trp  
 1 5 10 15  
 Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val  
 20 25 30  
 Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr Thr  
 35 40 45  
 Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp Asp  
 50 55 60  
 Val Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe Val  
 85 90 95  
 Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu Gln  
 100 105 110  
 Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe Thr  
 115 120 125  
 Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu  
 130 135 140  
 Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys  
 165 170 175  
 Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp  
 180 185 190  
 Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly Ser  
 195 200 205  
 Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala  
 210 215 220

Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln Gly  
 225 230 235 240

Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr Cys  
 245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His Ser  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu Thr  
 290 295 300

Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln Ser  
 305 310 315 320

Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr  
 325 330 335

Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe Thr  
 340 345 350

His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met Val  
 355 360 365

Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp Leu  
 370 375 380

Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val Ala  
 385 390 395 400

Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser  
 405 410 415

Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro  
 420 425 430

Ile Asn Ser Thr Phe Thr Ala Asn  
 435 440

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Iniciador

<400> 11

tacgccatgg tcgtccagtc gaccagc

27

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Iniciador

<400> 12

tacgccatgg tcgtccagtc gaccagcacg ggcgg

35

<210> 13

<211> 46

<212> DNA

<213> Iniciador

<400> 13

tacgccatgg tcgtccagtc gaccagcacg ggcggcgacc tcggca

46

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Iniciador

<400> 14

cgtactcgag tcatcgcgag ggggccttga agacggcgaa

40

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Iniciador

<400>	15		
		tgactcgaga ccggtgcgtc aggctttcgc	30
<210>	16		
<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	Iniciador		
<400>	16		
		taggatccga gtcccattgg cagcaccggc aacc	34
<210>	17		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	Iniciador		
<400>	17		
		taggatccga gtcctagcgg cggcaaccct cccggc	36
<210>	18		
<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	Iniciador		
<400>	18		
		taggatccga gtcccattac cggcaaccct agcg	34
<210>	19		
<211>	55		
<212>	DNA		
<213>	Iniciador		
<400>	19		
		cgtactcgag tcatcgcgag ccgatggggc cgaaggcgaa gccgccgtcg tcgtg	55
<210>	20		
<211>	52		

<212> DNA  
 <213> Iniciador

<400> 20  
 cgtactcgag tcatcgcgag ccgatctcgc cccagaagcc gccgtcgtcg tg 52

<210> 21  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> Iniciador

<400> 21  
 cgtactcgag tcatcgcgac gaggggatct ggacggcggg gaagccgccg tcgtcgtg 58

<210> 22  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Iniciador

<400> 22  
 cgtactcgag tcatcgcgag ccgatctcgc cccaggcgaa gccgccgtcg tc 52

<210> 23  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Iniciador

<400> 23  
 tcgtctcgag tcgcgatggg gccgaagcgg atgttgg 37

<210> 24  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Iniciador

<400> 24  
 ggagggcatg cccaacagca gcgagatcac c 31

<210>	25	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Iniciador	
<400>	25	
	cggcactagt tcgcgaccg atctcgccc agcgagg	38
<210>	26	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Iniciador	
<400>	26	
	cgccgagggc cggctcgaga gcatcc	26
<210>	27	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	Iniciador	
<400>	27	
	tgactcgaga ccgggtgctc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agagtaggca	60
	gggttcagg	69
<210>	28	
<211>	69	
<212>	DNA	
<213>	Iniciador	
<400>	28	
	tgactcgaga ccgggtgctc aggctttcgc acggagcttt acaggcactg agaggcgtaa	60
	gggttcagg	69
<210>	29	
<211>	69	
<212>	DNA	



<210> 34  
 <211> 67  
 <212> DNA  
 <213> Iniciador  
  
 <400> 34  
 ttaaacatat gttatctact ccaacatcaa ggtcggaccc attggcagca ccggcaacc 60  
 tagcggc 67  
  
 <210> 35  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Iniciador  
  
 <400> 35  
 tatatgcggc cgcaccggtg cgtcaggctt tcgcacggag ctttacaggc 50  
  
 <210> 36  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Iniciador  
  
 <400> 36  
 ttggatccga gtcgcagcac cggcaaccct agcg 34  
  
 <210> 37  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> Melanocarpus albomyces  
  
 <400> 37  
 Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
 20 25 30  
 Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
 35 40 45  
 Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
 50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Phe  
195 200 205

<210> 38

<211> 207

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 38

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
 100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
 130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
 145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
 165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
 180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Trp  
 195 200 205

<210> 39

<211> 208

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 39

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
 1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
 20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
 35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
 50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
 65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
 85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
 100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
 130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
 145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
 165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
 180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Pro Ala  
 195 200 205

<210> 40

<211> 208

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 40

Ala Asn Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys  
 1 5 10 15

Gly Trp Ala Gly Lys Gly Pro Val Asn Gln Pro Val Tyr Ser Cys Asp  
 20 25 30

Ala Asn Phe Gln Arg Ile His Asp Phe Asp Ala Val Ser Gly Cys Glu  
 35 40 45

Gly Gly Pro Ala Phe Ser Cys Ala Asp His Ser Pro Trp Ala Ile Asn  
 50 55 60

Asp Asn Leu Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ser Gly Gln Thr  
 65 70 75 80

Glu Glu Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly  
 85 90 95

Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly  
 100 105 110

Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn Ile Pro Gly Gly Gly Val  
 115 120 125

Gly Leu Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala  
 130 135 140

Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Gln Glu Cys Asp Ser Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala  
165 170 175

Asp Asn Pro Ser Phe Thr Phe Glu Arg Val Gln Cys Pro Glu Glu Leu  
180 185 190

Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg His Asp Asp Gly Gly Phe Ala Trp  
195 200 205

<210> 41

<211> 388

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 41

Gln Lys Pro Gly Glu Thr Pro Glu Val His Pro Gln Leu Thr Thr Phe  
1 5 10 15

Arg Cys Thr Lys Ala Asp Gly Cys Gln Pro Arg Thr Asn Tyr Ile Val  
20 25 30

Leu Asp Ser Leu Ser His Pro Val His Gln Val Asp Asn Asp Tyr Asn  
35 40 45

Cys Gly Asp Trp Gly Gln Lys Pro Asn Ala Thr Ala Cys Pro Asp Val  
50 55 60

Glu Ser Cys Ala Arg Asn Cys Ile Met Glu Gly Val Pro Asp Tyr Ser  
65 70 75 80

Gln His Gly Val Thr Thr Ser Asp Thr Ser Leu Arg Leu Gln Gln Leu  
85 90 95

Val Asp Gly Arg Leu Val Thr Pro Arg Val Tyr Leu Leu Asp Glu Thr  
100 105 110

Glu His Arg Tyr Glu Met Met His Leu Thr Gly Gln Glu Phe Thr Phe  
115 120 125

Glu Val Asp Ala Thr Lys Leu Pro Cys Gly Met Asn Ser Ala Leu Tyr  
130 135 140

Leu Ser Glu Met Asp Pro Thr Gly Ala Arg Ser Glu Leu Asn Pro Gly  
145 150 155 160  
Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Phe Val Thr  
165 170 175

Pro Phe Ile Asn Gly Ile Gly Asn Ile Glu Gly Lys Gly Ser Cys Cys  
 180 185 190

Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Arg Ala Thr His Val Ala  
 195 200 205

Pro His Thr Cys Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Met Cys Glu Gly Ala Glu  
 210 215 220

Cys Glu Tyr Asp Gly Val Cys Asp Lys Asp Gly Cys Gly Trp Asn Pro  
 225 230 235 240

Tyr Arg Val Asn Ile Thr Asp Tyr Tyr Gly Asn Ser Asp Ala Phe Arg  
 245 250 255

Val Asp Thr Arg Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Pro Ala Asp  
 260 265 270

Ala Glu Gly Arg Leu Glu Ser Ile His Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly  
 275 280 285

Lys Val Ile Glu Ser Tyr Val Val Asp Ala Pro Gly Leu Pro Arg Thr  
 290 295 300

Asp Ser Leu Asn Asp Glu Phe Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Arg Tyr  
 305 310 315 320

Leu Asp Leu Gly Gly Thr Ala Gly Met Gly Asp Ala Met Thr Arg Gly  
 325 330 335

Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe Met Asn  
 340 345 350

Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ala Gly Pro Cys Leu Pro Asp Glu Gly Asp  
 355 360 365

Pro Lys Asn Ile Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Glu Val Thr Tyr Ser  
 370 375 380

Asn Leu Arg Trp  
 385

<210> 42

<211> 421

<212> PRT

<213> Melanocarpus albomyces

<400> 42

Gln Arg Ala Gly Asn Glu Thr Pro Glu Asn His Pro Pro Leu Thr Trp  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Cys Thr Ala Pro Gly Asn Cys Gln Thr Val Asn Ala Glu Val  
 20 25 30  
 Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Asp Asp Asn Met Gln Asn  
 35 40 45  
 Cys Tyr Asp Gly Asn Gln Trp Thr Asn Ala Cys Ser Thr Ala Thr Asp  
 50 55 60  
 Cys Ala Glu Lys Cys Met Ile Glu Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly Asp Ala Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr  
 85 90 95  
 Lys His Glu Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Asn  
 100 105 110  
 Gly Pro Asp Lys Tyr Gln Met Phe Asn Leu Met Gly Asn Glu Leu Ala  
 115 120 125  
 Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Val Glu Cys Gly Ile Asn Ser Ala Leu  
 130 135 140  
 Tyr Phe Val Ala Met Glu Glu Asp Gly Gly Met Ala Ser Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Asn Gln Ala Gly Ala Arg Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys  
 165 170 175  
 Ala Arg Asp Leu Lys Phe Val Gly Gly Lys Ala Asn Ile Glu Gly Trp  
 180 185 190  
 Lys Ser Ser Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Pro Tyr Gly Ser  
 195 200 205  
 Cys Cys Ala Glu Ile Asp Val Trp Glu Ser Asn Ala Tyr Ala Phe Ala  
 210 215 220  
 Phe Thr Pro His Ala Cys Thr Thr Asn Glu Tyr His Val Cys Glu Thr  
 225 230 235 240  
 Thr Asn Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Glu Asp Arg Phe Ala Gly Lys Cys  
 245 250 255  
 Asp Ala Asn Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Tyr Arg Met Gly Asn Pro Asp  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Lys Gly Lys Thr Leu Asp Thr Ser Arg Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Ser Arg Phe Glu Glu Asn Lys Leu Ser Gln Tyr Phe Ile Gln Asp  
 290 295 300

Gly Arg Lys Ile Glu Ile Pro Pro Pro Thr Trp Glu Gly Met Pro Asn  
 305 310 315 320

Ser Ser Glu Ile Thr Pro Glu Leu Cys Ser Thr Met Phe Asp Val Phe  
 325 330 335

Asn Asp Arg Asn Arg Phe Glu Glu Val Gly Gly Phe Glu Gln Leu Asn  
 340 345 350

Asn Ala Leu Arg Val Pro Met Val Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp  
 355 360 365

His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Ile Tyr Pro Pro Glu Lys  
 370 375 380

Glu Gly Gln Pro Gly Ala Ala Arg Gly Asp Cys Pro Thr Asp Ser Gly  
 385 390 395 400

Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Gln Phe Pro Asp Ala Gln Val Val Trp  
 405 410 415

Ser Asn Ile Arg Phe  
 420

<210> 43

<211> 430

<212> PRT

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 43

Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr Trp  
 1 5 10 15

Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val  
 20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr Thr  
 35 40 45

Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp Asp  
 50 55 60

Val Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe Val  
 85 90 95

Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu Gln  
 100 105 110

Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe Thr  
 115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu  
 130 135 140

Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro Gly  
 145 150 155 160

Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys  
 165 170 175

Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp  
 180 185 190

Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly Ser  
 195 200 205

Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala  
 210 215 220

Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln Gly  
 225 230 235 240

Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr Cys  
 245 250 255

Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His Ser  
 260 265 270

Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr Val  
 275 280 285

Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu Thr  
 290 295 300

Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln Ser  
 305 310 315 320

Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr  
 325 330 335

Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe Thr  
 340 345 350  
 His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met Val  
 355 360 365

Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp Leu  
 370 375 380

Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val Ala  
 385 390 395 400

Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser  
 405 410 415

Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val  
 420 425 430

<210> 44

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 44

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr  
 50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 45

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 45

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Ala  
 50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 46

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 46

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr  
 50 55 60

Ala Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 47

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 47

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Trp  
 50 55 60

Tyr Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 48

<211> 69

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 48

Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly  
 20 25 30

Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly  
 35 40 45

Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Ala  
 50 55 60

Ala Ser Gln Cys Leu  
 65

<210> 49

<211> 58

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 49

Thr Gly Asn Pro Ser Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr  
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
 20 25 30

Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln  
 35 40 45

Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
 50 55

<210> 50

<211> 42

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 50

Thr Gly Asn Pro Ser Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
 1 5 10 15

Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln  
 20 25 30

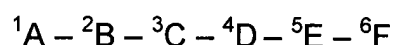
Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu

## REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão de celulase, caracterizada pelo fato de que compreende:

- 5 A. uma primeira sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivada de uma espécie, e
- B. uma segunda sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou de um domínio de ligação à celulose (CBD) derivada de outra espécie,

10 em que a referida primeira sequência de aminoácidos e a referida segunda sequência de aminoácidos estão conectadas por uma região de junção com a seguinte fórmula geral:



em que

15  ${}^1A$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^1A$  é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

${}^2B$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente  ${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

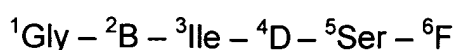
20  ${}^3C$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente  ${}^3C$  é Ile;

${}^4D$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^4D$  é Gly ou Pro;

${}^5E$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente  ${}^5E$  é Ser; e

25  ${}^6F$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente  ${}^6F$  é Ser ou está ausente; em que  ${}^1A$  está ligado na sequência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e  ${}^6F$  está ligado na sequência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

30 2. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a região de junção tem a seguinte fórmula geral:



em que

<sup>2</sup>B é Pro, Gln, ou Glu;

<sup>4</sup>D é Gly ou Pro;

<sup>5</sup>E é Ser; e

5 <sup>6</sup>F é Ser ou está ausente.

3. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a região de junção tem a seguinte fórmula:

<sup>1</sup>Val – <sup>2</sup>Gln – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Pro – <sup>5</sup>Ser – <sup>6</sup>Ser.

10 4. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a região de junção tem a fórmula:

<sup>1</sup>Gly – <sup>2</sup>Glu – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Gly – <sup>5</sup>Ser ou <sup>1</sup>Gly – <sup>2</sup>Pro – <sup>3</sup>Ile – <sup>4</sup>Gly – <sup>5</sup>Ser.

15 5. Proteína de fusão de celulase de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a referida primeira sequência de aminoácidos é de uma celulase neutra e a referida segunda sequência de aminoácidos é de uma celulase ácida.

6. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a referida primeira sequência de aminoácidos é da celulase da família 45 e a referida segunda sequência de aminoácidos é da celulase da família 7.

20 7. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a referida celulase neutra é de origem fúngica.

25 8. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a referida celulase neutra é derivada dos gêneros de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, *Talaromyces* ou *Chaetomium*, preferivelmente de um *Melanocarpus sp*, mais preferivelmente de *Melanocarpus albomyces*.

30 9. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida celulase é celulase 20K de *Melanocarpus albomyces*, celulase 50K, celulase 50KB ou um derivado do mesmo.

10. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida celulase é CBHI de *Thermoascus aurantiacus* ou um derivado do mesmo.

5 11. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a referida celulase ácida é derivada de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, preferivelmente de *Trichoderma reesei*.

10 12. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a referida celulase neutra é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 ou um derivado do mesmo, e a segunda sequência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei* da SEQ ID NO: 4 ou um derivado do mesmo.

15 13. Proteína de fusão de celulase de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que a referida primeira sequência de aminoácidos e/ou a referida segunda sequência de aminoácidos é modificada.

20 14. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que na referida segunda sequência de aminoácidos, o aminoácido tirosina na posição 492 (posição 31 do CBD) e/ou 493 (posição 32 do CBD) de CBHI de maduro *Trichoderma reesei* é substituído com um aminoácido alifático, preferivelmente com alanina, e/ou com um aminoácido aromático, preferivelmente com triptofano.

25 15. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a referida segunda sequência de aminoácidos, é selecionada de um grupo da SEQ ID NO: 45, 46, 47 e 48.

16. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que na referida segunda sequência de aminoácidos, os aminoácidos 434 a 444 ou 434 a 460 da sequência de CBHI de *Trichoderma reesei* maduro são anulados.

30 17. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a referida segunda sequência de aminoácidos é selecionada de um grupo da SEQ ID NO: 49 e 50.

18. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que na referida primeira sequência de aminoácidos, o aminoácido valina na posição 208 da sequência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi anulado.

5 19. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que na referida primeira sequência de aminoácidos, o aminoácido alanina na posição 207 da sequência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi anulado.

10 20. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que na referida primeira sequência de aminoácidos, o aminoácido fenilalanina na posição 209 da sequência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2 foi substituído com Trp.

15 21. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que na referida primeira sequência de aminoácidos, o aminoácido contém uma prolina inserida depois da posição 206 na sequência de celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* da SEQ ID NO: 2.

20 22. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que na referida primeira sequência de aminoácidos, o aminoácido é selecionado do grupo de SEQ ID NO: 37, 38, 39 e 40.

23. Proteína de fusão de celulase de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizada pelo fato de que a referida proteína de fusão é estável.

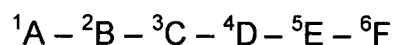
25 24. Proteína de fusão de celulase de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizada pelo fato de que uma preparação contendo a referida proteína de fusão foi adicionalmente estabilizada por tratamento com aquecimento.

30 25. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida primeira celulase naturalmente não tem um CBD.

26. Proteína de fusão de celulase de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o CBD foi anulado da referida primeira ce-

lulase.

27. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira sequência de polinucleotídeo codificando uma primeira sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um núcleo de celulase derivado de uma espécie, e uma sequência de polinucleotídeo codificando uma segunda sequência de aminoácidos opcionalmente modificada de um ligante e/ou um domínio de ligação à celulose (CBD) derivado de outra espécie, e uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma região de junção conectando as referidas primeira e segunda sequências de aminoácidos, a referida região de junção com a seguinte fórmula geral:



em que

${}^1A$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^1A$  é Gly ou Val, mais preferivelmente Gly;

${}^2B$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, Phe, Val, Glu, Asp, Gln, e Asn; preferivelmente  ${}^2B$  é Pro, Gln, ou Glu;

${}^3C$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Lys, Leu, Pro, Ile, Val, Ser e Thr; preferivelmente  ${}^3C$  é Ile;

${}^4D$  é selecionado de um grupo consistindo em Gly, Ala, Leu, Pro, Ile, e Val; preferivelmente  ${}^4D$  é Gly ou Pro;

${}^5E$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Pro e Thr; preferivelmente  ${}^5E$  é Ser; e

${}^6F$  é selecionado de um grupo consistindo em Ser, Thr ou está ausente, preferivelmente  ${}^6F$  é Ser ou está ausente; em que  ${}^1A$  está ligado na sequência de aminoácidos C-terminal do núcleo de celulase e  ${}^6F$  está ligado na sequência de aminoácidos N-terminal do ligante e/ou domínio (CBD).

28. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a primeira sequência de polinucleotídeo codifica um núcleo de celulase neutro e a referida segunda sequência de polinucleotídeo codifica um ligante e/ou um domínio de ligação à celulose (CBD) de uma celulase ácida.

29. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 28, carac-

terizado pelo fato de que a referida celulase neutra é derivada do gênero de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Thermoascus*, *Scopulariopsis*, *Myriococcum*, *Talaromyces* ou *Chaetomium*, preferivelmente de um *Melanocarpus sp*, mais preferivel-  
5 mente de *Melanocarpus albomyces*.

30. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a referida celulase é celulase 20K de *Melanocarpus albomyces*, celulase 50K, celulase 50KB ou um derivado dos mesmos.

31. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a referida celulase é CBHI de *Thermoascus aurantiacus*.  
10

32. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida celulase ácida é derivada de *Trichoderma sp.* ou *Hypocrea*, preferivelmente de *Trichoderma reesei*.

33. Vetor de expressão de celulase de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida celulase neutra é a celulase 20K de *Melanocarpus albomyces* codificada pela SEQ ID NO: 1 ou um derivado do mesmo, e a segunda sequência de aminoácidos é o ligante e/ou CBD da celobio-hidrolase I de *Trichoderma reesei* codificada pela SEQ ID  
15  
20 NO: 3 ou um derivado do mesmo.

34. Vetor de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 33, caracterizado pelo fato de que a referida primeira sequência de aminoácidos e/ou a referida segunda sequência de aminoácidos é modificada.

35. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a referida segunda sequência de polinucleotídeo codifica uma sequência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 45, 46, 47 e 48.  
25

36. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a referida segunda sequência de polinucleotídeo codifica uma sequência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 49 e 50.  
30

37. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o referido primeiro polinucleotídeo codifica uma sequência de aminoácidos selecionada de um grupo de SEQ ID NO: 37, 38, 39 e 40.

5                   38. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a referida primeira sequência de polinucleotídeo codifica uma celulase, a qual naturalmente não tem um CBD.

                    39. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreendendo um vetor de expressão como definido em qualquer uma das reivindicações 27 a 38.

10                   40. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que é de origem fúngica.

                    41. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que pertence ao fungo filamentosos.

15                   42. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 40 ou 41, caracterizada pelo fato de que pertence ao gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

                    43. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que é *Trichoderma reesei*.

20                   44. Processo para a produção de uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de cultivar a célula hospedeira, como definida em qualquer uma das reivindicações 40 a 43, e a recuperação da proteína do meio de cultura.

25                   45. Preparação de enzima, caracterizada pelo fato de que compreendendo uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26.

                    46. Processo para desbotamento, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de adicionar uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou a preparação como definida na reivindicação 45 a peças de vestuário ou tecido contendo algodão.

30

47. Processo de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o tecido ou peças de vestuário é um tecido grosseiro.

48. Processo para bioacabamento, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de adicionar uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou a preparação como definida na reivindicação 45 para materiais têxteis como tecidos ou peças de vestuário ou fios.

49. Processo de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que os materiais têxteis são produzidos a partir de celulose natural contendo fibras ou fibras contendo celulose domésticas ou são misturas destes.

50. Processo de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que os materiais têxteis são misturas de fibras sintéticas e de fibras contendo celulose.

51. Composição detergente, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26, ou a preparação de enzima como definida na reivindicação 45 e adjuvantes, tais como agentes ativos de superfície, tensoativos, agentes alvejantes ou abrasivos.

52. Método de tratamento de fibra celulósica, contendo material têxtil, caracterizado pelo fato de que o referido método compreende o contato do referido material têxtil com a composição detergente como definida na reivindicação 51.

53. Método para tratar fibra ou polpa derivada de madeira, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de adicionar uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou a preparação como definido na reivindicação 45 para polpa química ou mecânica derivada de madeira ou fibra secundária.

54. Método para melhorar a qualidade de ração animal, caracterizado pelo fato de que compreende o tratamento do material vegetal com uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 ou a preparação como definido na reivindicação 45.

## RESUMO

Patente de Invenção: "PROTEÍNA DE FUSÃO DE CELULASE, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DETERGENTE CONTENDO A MESMA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, PROCESSOS PARA DESBOTAMENTO E PARA BIOACABAMENTO E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE FIBRA CELULÓSICA CONTENDO MATERIAL TÊXTIL, PARA TRATAR FIBRA OU POLPA DERIVADA DE MADEIRA E PARA MELHORAR A QUALIDADE DE RAÇÃO ANIMAL".

10                   A presente invenção fornece novas proteínas de fusão de celulase, preparações de proteínas de fusão de celulase e composições de proteínas de fusão de celulase. A presente invenção se refere ainda a vetores de expressão de celulase, células hospedeiras expressando celulase e métodos para preparar tais vetores e células. Os usos de celulases, preparações de celulase e composições de celulase nas indústrias têxtil, de deter-  
15                   gente, polpa e papel também são fornecidos.