

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

(21) **PI0710187-2 A2**

(22) Data de Depósito: 12/04/2007
(43) Data da Publicação: 09/08/2011
(RPI 2118)



(51) Int.Cl.:

C12N 9/42 2006.01
C12N 15/62 2006.01
C12N 15/56 2006.01
C12N 15/63 2006.01
D06M 16/00 2006.01
C11D 3/386 2006.01
A23K 1/165 2006.01

(54) Título: **PROTEÍNAS DE FUSÃO ENZIMÁTICA E SEU USO**

(30) Prioridade Unionista: 13/04/2006 US 11/404,065,
13/04/2006 FI 20065234, 13/04/2006 FI 20065234, 13/04/2006 US
11/404,065

(73) Titular(es): AB ENZIMES OY

(72) Inventor(es): Jari Vehmaanperä, Jarno Kallio, Leena
Valtakari, Marika Alapuranen, Pentti Ojapalo

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

(86) Pedido Internacional: PCT FI2007050196 de 12/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/118935 de 25/10/2007

(57) Resumo: PROTEÍNAS DE FUSÃO ENZIMÁTICA E SEU USO. São descritas proteínas de fusão de celulase compreendendo uma região de núcleo de endoglucanase e um domínio de ligação de celulose heterólogo. As proteínas de fusão podem ser produzidas por técnicas recombinantes usando polinucleotídeos apropriados, expressando vetores de células hospedeiras. As proteínas de fusão e preparações enzimáticas das mesmas são úteis para tratar material celulósico, tal como material têxtil, e são particularmente úteis em bioesmerilhamento de denim ou em bioacabamento de tecidos e vestuário. Além disso, as proteínas de fusão podem ser usadas na indústria de papel e polpa, em extração de óleo de plantas, composições de detergente, ou para melhorar a qualidade de ração animal.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROTEÍNAS DE FUSÃO ENZIMÁTICA E SEU USO**".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a tecnologia enzimática, e mais precisamente a proteínas de fusão de celulase compreendendo um domínio catalítico e um domínio de ligação de celulose. As proteínas de fusão podem ser produzidas por técnicas recombinantes usando polinucleotídeos apropriados, expressando vetores e células hospedeiras, as quais também são englobadas pela invenção. As proteínas de fusão e preparações enzimáticas das mesmas são úteis para tratar material celulósico, tal como material têxtil. Além das proteínas de fusão podem ser usadas na indústria de polpa e papel, extração de óleo de plantas, composições de detergente, ou para melhorar a qualidade de ração animal. A invenção portanto refere-se adicionalmente a um processo para tratar material celulósico com a proteína de fusão, e especialmente a processos para bioesmerilhamento ou bioacabamento de tecidos ou roupas, especialmente denim. A invenção ainda refere-se adicionalmente a composições de detergente e ração animal contendo as proteínas de fusão.

Antecedentes da Invenção

Celulose é o principal componente estrutural de plantas superiores e ocorre naturalmente em forma quase pura somente em fibra de algodão. Proporciona células vegetais com elevada resistência à tração ajudando as mesmas a resistir à tensão mecânica e à pressão osmótica. Celulose é um polissacarídeo linear de resíduos glicose conectados por 1-4, 1-6 ligações. Na natureza celulose é geralmente associada com lignina e hemiceluloses. Material celulósico é degradado na natureza por uma série de vários organismos incluindo bactérias e fungos. A conversão biológica de celulose para glicose geralmente requer três grupos importantes de enzimas: celobiohidrolases (CBH), endoglucanases (EG) e beta-glucosidases (BG).

Há um amplo espectro de aplicações industriais de celulasas. Na indústria têxtil, celulasas são usadas em acabamento de denim para criar um lavado a pedra da moda em tecidos de denim em um processo de bio-

esmerilhamento. Celulases também são usadas, por exemplo, para limpar felpa e prevenir a formação de bolinhas sobre a superfície de roupas de algodão. Na indústria de detergentes as celulases são usadas para dar brilho às cores e para prevenir o acinzentamento e a formação de bolinhas das roupas. Adicionalmente as celulases são usadas na indústria de alimentos e na fabricação de ração animal, e têm um grande potencial na indústria de polpa e papel, por exemplo, em destintagem para liberar tinta de superfícies de fibras e na melhora da drenagem da polpa.

Celulases industrialmente usadas são freqüentemente misturas de enzimas tendo uma variedade de atividades e especificidades de substratos. As preparações enzimáticas comerciais freqüentemente compreendem todas as três atividades de celulase, isto é, CBH, EG e BG. Além disso as propriedades únicas de cada celulase tornam algumas mais adequadas para alguns propósitos do que outras, e portanto também têm sido esforços para obter e usar celulases tendo somente as atividades desejadas. As celulases de origem fúngica mais amplamente usadas são derivadas de *Trichoderma reesei*. No entanto, também outras fontes fúngicas foram sugeridas, por exemplo, na Patente U.S. Nº U.S. 5.457.046.

Celulases aplicadas em tratamento de denim são geralmente divididas em dois grupos principais: celulases ácidas e neutras. Celulases ácidas tipicamente operam em pH 4.0 a 5.5 e celulases neutras na faixa de pH 6 a 8. Celulases tendo características tanto do grupo ácido quanto neutro podem ser denominadas celulases híbridas. Celulases ácidas usadas em bioesmerilhamento se originam essencialmente de *Trichoderma reesei* (forma sexual *Hypocrea jecorina*) e as celulases neutras se originam de uma variedade de fungos, incluindo gêneros de *Melanocarpus*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Fusarium*, *Acremonium*, e *Chrysosporium* (Haakana et al. 2004). Enzimas de *T. reesei* incluem, por exemplo, celulases da família 5 de glicosil hidrolase (endoglucanase II, EGII), família 7 (celobiohidrolase I, CBHI) e família 12 (endoglucanase III, EGIII; Ward et al. 1993), e as celulases neutras, o mais freqüentemente endoglucanases, da família 45 e família 7 (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993, 1996).

A Patente dos U.S. Nº 5.874.293 revela uma composição de celulase aprimorada compreendendo quantidades elevadas de endoglucanase EGII de *T. reesei* para tratar têxteis contendo celulose. A composição aprimorou propriedades de cor, aumentou a luminosidade e o aspecto visual e reduziu tendências a formação de bolinhas. A patente internacional Nº WO 97/14804 revela uma celulase de 20 kDa e uma de 50 kDa com atividade de endoglucanase derivada de *Melanocarpus* sp. que são especialmente úteis na indústria têxtil e de detergentes. Proteínas de fusão contendo as proteínas de 20K ou de 50K encadeadas a um domínio de ligação de celulose preferencialmente de *Trichoderma reesei* são sugeridas para criar novas propriedades enzimáticas. Não são dados exemplos específicos, nem são as propriedades desejadas descritas.

No entanto, ainda há a necessidade de celulases aprimoradas, inclusive endoglucanases que sejam mais eficientes no tratamento de tecidos e em outros campos, onde tradicionalmente são usadas celulases. Em particular, há uma necessidade contínua de celulases mais eficientes para aumentar a economia do processo. A presente invenção visa satisfazer estas necessidades.

Na indústria têxtil um aspecto lavado à pedra ou um aspecto desgastado tem sido de interesse dos produtores de denim nos últimos anos. A lavagem à pedra tradicional com pedras-pomes reduz a resistência do tecido e sobrecarrega os aparelhos de lavar roupas. Há uma tendência para processos de acabamento de denim enzimáticos, e celulases têm substituídos ou estão sendo usadas junto com pedras-pomes para dar ao tecido seu aspecto "usado" desejado. Tratamentos enzimáticos controlados resultam em menor dano para as roupas e máquinas e eliminam a necessidade de remoção das pedras.

Um problema geral associado com lavagem à pedra enzimático é retropigmentação causado por redeposição de pigmento Índigo removido durante ou depois de abrasão. A redeposição de pigmento Índigo reduz o contraste desejado entre os fios brancos e tingidos de índigo e pode ser mais facilmente observada sobre o lado reverso do denim e os bolsos interi-

ores (como aumento do azulamento). Sobre o lado da face isto pode ser visto como contraste reduzido entre áreas tingidas e áreas das quais o pigmento foi removido durante o bioesmerilhamento. A retropigmentação pode ser reduzida usando agentes anti-retropigmentação tais como álcoois etoxilados não-iônicos durante o tratamento ou adicionando agentes alvejantes durante etapas de enxágüe. A natureza da enzima tem um impacto sobre a retropigmentação. Geralmente, celulasas neutras retropigmentam menos do que celulasas ácidas.

A publicação de patente internacional Nº WO97/09410 descreve que a adição de um certo tipo de celulase a outra celulase tendo atividade abrasiva reduz a retropigmentação. A celulase adicional pertence à família 5 ou 7, mas não tem efeito abrasivo significativo por si só. Preferencialmente, a referida celulase adicional se origina de *Bacillus* ou *Clostridium*.

A Patente U.S. Nº 5.916.799 revela composições de celulase contendo tanto celobiohidrolases quanto endoglucanases que foram submetidas à proteólise limitada para separar o núcleo e domínios de ligação das enzimas. Foi visto que as composições enzimáticas obtidas reduzem a retropigmentação. A publicação de patente internacional Nº WO94/07983 refere-se ao achado de que redeposição de colorante sobre tecido durante o processo de lavagem à pedra pode ser reduzido empregando uma composição de celulase fúngica, a qual é substancialmente livre de componentes do tipo de celobiohidrolase. A publicação de patente internacional Nº WO96/23928 revela tratamento de tecidos contendo celulose com enzimas celulasas truncadas. Foi visto que as enzimas truncadas carecendo de domínio de ligação de celulose (CBD) reduzem redeposição de corante e aumentam abrasão.

A conclusão geral das três referências citadas acima pode ser que o domínio de ligação de celulose tem um efeito negativo sobre a retropigmentação. No entanto, a presente invenção agora proporciona uma construção de celulase com baixa propriedade de retropigmentação, apesar da presença de um domínio de ligação de celulose.

Sumário da Invenção

A presente invenção baseia-se na descoberta surpreendente de

que o efeito da endoglucanases pode ser significativamente reforçado ligando a essa um domínio de ligação de celulose em particular sem prejudicar as propriedades de retropigmentação.

Um objetivo da presente invenção é proporcionar novas proteínas de fusão de endoglucanase tendo aprimoradas propriedades hidrolíticas para uso em indústria têxtil, especialmente em lavagem à pedra de denim. As proteínas de fusão da invenção têm a vantagem de serem ativas tanto em valores de pH ácidos quanto neutros, e têm performance altamente aprimorada em aplicações de bioesmerilhamento. Quando usadas no tratamento de denim, as proteínas de fusão proporcionam um baixo efeito de retropigmentação. Com a aprimorada eficiência das endoglucanases da invenção, o uso das enzimas é significativamente mais econômico. Vantagens adicionais são obtidas também em termos de logística e do armazenamento dos produtos enzimáticos, porque são necessárias quantidades menores do produto enzimático. As proteínas de fusão também são úteis em composições de detergente, bem como em outros campos tais como indústria de ração, extração de óleo de plantas, ou indústria de polpa e papel.

Um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar polinucleotídeos codificando as novas proteínas de fusão de endoglucanase.

Um objetivo ainda adicional da presente invenção é proporcionar um método para produzir as proteínas de fusão.

Um objetivo ainda adicional da presente invenção é proporcionar novos vetores de expressão contendo os referidos polinucleotídeos, úteis para a produção das proteínas de fusão endoglucanase, bem como novos hospedeiros transformados com os referidos vetores de expressão.

Um objetivo ainda adicional da presente invenção é proporcionar preparações enzimáticas, as quais contêm uma ou mais novas proteínas de fusão de endoglucanase.

Um objetivo ainda adicional da presente invenção é proporcionar métodos para tratar material celulósico com a proteína de fusão, por exemplo, para uso na indústria têxtil, de detergente, de ração animal, de extração de óleo de plantas, ou de polpa e papel, e particularmente para acabamento

de têxteis, especialmente para bioesmerilhamento e bioacabamento de denim.

Um objetivo ainda adicional da presente invenção é proporcionar ração animal ou composições detergentes contendo as proteínas de fusão.

5 A presente invenção refere-se a uma proteína de fusão de celulase compreendendo uma primeira seqüência de aminoácidos de um núcleo de endoglucanase, e uma segunda seqüência de aminoácidos compreendendo um encadeador e domínio de ligação de celulose (CBD) tendo no mínimo 75% de identidade com a SEQ ID NO: 15, ou uma variante ou fragmento da mesma tendo atividade de ligação de celulose.

A invenção refere-se adicionalmente a um polinucleotídeo isolado selecionado entre o grupo consistindo de:

a) uma seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3 ou 5, ou uma seqüência codificando uma proteína de fusão de celulase da reivindicação 1,

b) um filamento complementar de a),

c) uma seqüência que é degenerada em consequência do código genético a qualquer uma das seqüências de a) ou b).

20 A invenção refere-se ainda adicionalmente a um vetor de expressão compreendendo a referida seqüência de nucleotídeos, e a uma célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão, bem como a uma preparação enzimática compreendendo a proteína de fusão.

25 A invenção também engloba um método para produzir a proteína de fusão, compreendendo as etapas de transformar uma célula hospedeira com um vetor de expressão codificando a referida proteína de fusão e cultivar a referida célula hospedeira sob condições possibilitando expressão da referida proteína de fusão, e opcionalmente recuperar e purificar a proteína de fusão produzida.

30 A invenção ainda engloba adicionalmente um processo para tratar material celulósico, em que o referido processo compreende contactar o material celulósico com a proteína de fusão.

A invenção também refere-se a um processo para bioesmeri-

lhamento, cujo processo compreende a etapa de contactar a proteína de fusão de celulase ou a preparação enzimática com tecido ou roupas de denim, e a um processo para bioacabamento, o qual compreende a etapa de contactar a proteína de fusão de celulase ou a preparação enzimática com materiais têxteis como tecidos ou roupas ou fio.

Eventualmente, a invenção refere-se a uma composição de detergente compreendendo a proteína de fusão e auxiliares detergentes, a ração animal compreendendo a proteína de fusão, e a uma cepa de *Escherichia coli* tendo número de acesso de *E. coli* DSM 18159.

Modalidades específicas da invenção são determinadas nas reivindicações dependentes.

Outros objetivos, detalhes e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes a partir dos seguintes desenhos, descrição detalhada e exemplos.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 ilustra uma esboço esquemático do cassete de expressão usado na transformação de protoplastos de *T. reesei* para produção de celulase de *T. aurantiacus* EG28 ou EG28+CtCBD. O gene *ce/5A* ou *ce/5A_Ct ce/7AlinkerCBD* está sob controle do promotor de *T. reesei cbhl* (*cbhl* prom) e terminação de transcrição é assegurada com a adição do terminador *cbhl* (*cbhl* term). O gene *amdS* (*amdS*) é incluído para seleção de transformantes. O cassete de expressão para produção de EG28 e EG28+CtCBD foi isolado como um fragmento *NotI* de 8,6 kb de pALK1930 ou como um fragmento *NotI* de 8,9 kb de pALK1948, respectivamente.

A Figura 2 ilustra a dependência de pH da celulase de *T. aurantiacus* EG28 produzida de modo heterólogo determinando a partir do sobrenadante da cultura usando CMC como substrato em uma reação de 10 min a 50°C (A). A temperatura ótima da celulase EG28 foi determinada em pH ótimo (6.0). A reação contendo CMC como substrato foi realizada por 10 min (B). O pH e temperatura ótimos da proteína de fusão EG28+CtCBD foram determinados para serem o mesmo que os da celulase EG28 selvagem.

A Figura 3 mostra o efeito de bioesmerilhamento de celulase

EG28, medindo a cor, em diferentes temperaturas e pH 6.

A Figura 4 mostra o efeito de bioesmerilhamento de EG28+CtCBD celulase, medindo a cor, em diferentes valores de pH a 50°C.

A Figura 5 mostra o efeito de bioesmerilhamento de EG28+CtCBD celulase, medindo a cor, em diferentes valores de pH a 60°C.

A Figura 6 mostra o efeito de bioesmerilhamento de EG28+CtCBD celulase, medindo a cor, em diferentes temperaturas (pH 6).

A Figura 7 mostra a Influência da temperatura de peletização sobre a recuperação da atividade de betaglucanase de rações suplementadas com celulase EG28.

A Figura 8 mostra a Influência da temperatura de peletização sobre a recuperação da atividade de celulase de rações suplementadas com celulase EG28+CtCBD.

Descrição Detalhada da Invenção

Celulases compreendem um domínio catalítico / núcleo (CD) expressando atividade de celulase. Além do domínio catalítico a molécula de celulase pode compreender um ou mais "domínios de ligação de celulose" ("CBDs"), também denominados como domínios / moléculas de ligação de carboidrato (CBD/CBM), os quais podem estar localizados ou no N- ou no C-término do domínio catalítico. CBDs têm atividade de ligação de carboidrato e mediam a ligação da celulase a celulose cristalina mas têm pouco ou nenhum efeito sobre a atividade hidrolítica da enzima sobre substratos solúveis. Estes dois domínios são tipicamente conectados através de uma região de encadeador flexível e altamente glicosilada, aqui, neste requerimento de patente, denominada "encadeador". Os constructos referidos são descritos, por exemplo, em Srisodsuk et al., 1993. Algumas das endoglucanases que ocorrem naturalmente e celobiohidrolases têm um domínio de ligação de celulose (CBD), enquanto outras não.

Endoglucanases (EGs) são um dos três tipos de celulases geralmente necessários para a conversão biológica de celulose em glicose. Endoglucanases cortam ligações beta-1,4-glucosídicas internas, ao passo que celobiohidrolases cortam a dissacarídeo celobiose do fim da cadeia po-

limérica de celulose e beta-1,4-glucosidases hidrolisam a celobiose e outros celooligossacarídeos curtos para glicose. "Endoglucanase" ("EG") em relação com a presente invenção refere-se a enzimas classificadas como E.C. 3.2.1.4. São 1,4- beta-D-glucano 4-glucanohidrolases e catalisam endohidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em polímeros de glicose tais como celulose. Algumas endoglucanases também podem hidrolisar, por exemplo, 1,4-ligações em beta-D-glucanos também contendo 1,3-ligações. Portanto também podem ser classificadas como endo-1,3(4)-betaglucanases (E.C. 3.2.1.6). Portanto, uma enzima pode catalisar reações sobre vários substratos e pode pertencer a múltiplas classes.

Celulases incluindo endoglucanases também podem ser classificadas em várias famílias de glicosil hidrolase de acordo com sua seqüência primária, suportadas por análise da estrutura tridimensional de alguns membros da família (Henrissat 1991, Henrissat e Bairoch 1993, 1996). Por exemplo, a família 45 (anteriormente celK) contém endoglucanases (EC 3.2.1.4), e a família 5 (anteriormente conhecida como celA) consiste essencialmente de endoglucanases (EC 3.2.1.4). A família 7 (anteriormente celulase família celC) contém tanto endoglucanases quanto celobiohidrolases. Algumas glicosil hidrolases são enzimas multifuncionais que contêm domínios catalíticos que pertencem a diferentes famílias de glicosil hidrolase. Para os presentes fins a parte de endoglucanase da proteína de fusão preferencialmente pertence à família 45 ou família 5 de glicosídeo hidrolase, e mais preferencialmente à família 5.

De acordo com uma modalidade preferencial da invenção a parte endoglucanase da proteína de fusão é derivada de um fungo, preferencialmente do gênero *Thermoascus*, e mais preferencialmente de *Thermoascus aurantiacus*. Uma endoglucanase semelhante foi descrita, por exemplo, por Hong et al. 2003. A patente internacional Nº WO 03/062409 sugere usar esta enzima para aplicações de ração, porque além de endoglucanase também tem atividade de beta-glucanase. O mais preferencialmente a endoglucanase é derivada de *T. aurantiacus* cepa ALK04242 depositada como CBS 116239. O gene de endoglucanase da referida cepa foi inserido no plasmí-

deo pALK1926 e depositado como DSM 17326. A proteína codificada por este gene é referida aqui, neste requerimento de patente, como "Ta EG28" ou simplesmente "EG28".

Alternativamente, a parte endoglucanase da proteína de fusão
5 pode ser obtida a partir de *Acremonium sp.* preferencialmente de *A. thermophilum*, e mais preferencialmente de uma cepa tendo as características da cepa ALK04245 depositada como CBS 116240. A endoglucanase obtível a partir desta cepa e codificada pelo gene ce/45A é referida aqui, neste requerimento de patente, como "At EG40" ou simplesmente "EG40".

10 "Núcleo" de endoglucanase conforme usado aqui, neste requerimento de patente, significa o domínio catalítico / núcleo (CD) de uma enzima expressando no mínimo atividade de endoglucanase. Um domínio catalítico semelhante pode estar em sua forma natural (isto é, intacto) ou pode ser modificado.

15 De acordo com uma modalidade da invenção, o núcleo de endoglucanase tem no mínimo 75, 80, 85, 90, 95, 98 ou 99% de identidade com a SEQ ID NO: 2 (Ta EG28). Preferencialmente, o núcleo compreende no mínimo a proteína madura, a qual corresponde aos aminoácidos 19 a 334 da SEQ ID NO: 2. A previsão da seqüência de sinalização foi feita usando o
20 programa SignalP V3.0 (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004); o valor de NN foi obtido usando redes neurais e o valor de HMM foi obtido usando modelos de Markov oculto. Alternativamente, a parte endoglucanase da proteína de fusão tem no mínimo 75, 80, 85, 90, 95, 98 ou 99% de identidade com o núcleo de endoglucanase de At EG40, codificado por um polinucleótido compreendido na SEQ ID NO: 8. Preferencialmente, o núcleo compreende no mínimo a proteína madura, a qual corresponde aos aminoácidos 22
25 a 297 de EG40.

"Celobiohidrolase" ou "CBH" conforme usado aqui, neste requerimento de patente, refere-se a enzimas que clivam celulose da extremidade
30 da cadeia de glicose e produzem essencialmente celobiose. Também são denominadas 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolases ou celulose 1,4-beta-celobiosidases. Hidrolisam as ligações 1,4-beta-D-glucosídicas das extremi-

dades redutoras ou não redutoras de um polímero contendo as referidas ligações, tais como celulose, por meio do que é liberada celobiose.

O CBD incluindo o encadeador é preferencialmente derivado de *Chaetomium thermophilum*, e especialmente do gene codificando celobiohidrolase (CBHI/Cel7A) de cepa ALK04265, depositado como CBS 730.95. Este CBD incluindo o encadeador é referido como "CtCBD". De acordo com uma modalidade preferencial da invenção, o encadeador mais o domínio de ligação de celulose tem uma sequência que tem no mínimo 80, 85, 90, 95, 98 ou 99% de identidade com a SEQ ID NO: 15, (a qual corresponde aos aminoácidos 335 a 415 da SEQ ID NO: 4). De acordo com outra modalidade preferencial a segunda sequência de aminoácidos compreende os aminoácidos 335 a 379 de SEQ ID NO: 4.

O termo "derivado de" em relação com uma fonte de microorganismo significa que o polipeptídeo pode ser produzido naturalmente pela referida fonte de microorganismo específico, ou o polinucleotídeo codificando o polipeptídeo pode ser isolado da referida fonte de microorganismo, ou o termo significa uma célula hospedeira na qual o polinucleotídeo da referida fonte de microorganismo codificando o polipeptídeo foi introduzido. No entanto, não exclui modificações menores da sequência, por exemplo, por substituição, eliminação, inversão e/ou inserção de um ou uns poucos aminoácidos / códons na medida que a atividade biológica da proteína codificada seja retida.

O núcleo, e o encadeador+CBD, respectivamente, também pode ser um fragmento ou uma variante das referidas sequências, em que o referido fragmento ou variante tem atividade de celulase e/ou atividade de ligação de celulose. Por exemplo, a primeira sequência de aminoácidos pode compreender um fragmento ou variante de uma sequência de aminoácidos tendo no mínimo 75% de identidade com a SEQ ID NO: 2 ou 8, e a segunda sequência de aminoácidos pode compreender um fragmento ou variante de uma sequência de aminoácidos tendo no mínimo 75% de identidade com a SEQ ID NO: 15.

No presente contexto "atividade de celulase" significa capacida-

de catalítica para hidrolisar celulose ou derivados da mesma, tais como atividade de endoglucanase ou betaglucanase. Além de atividade de endoglucanase e/ou beta-glucanase, algumas das celulasas podem ter adicionalmente atividade de hemicelulase e/ou xilanase.

5 Conforme usado no presente contexto o termo "identidade" refere-se à identidade global entre duas seqüências de aminoácidos comparadas umas com as outras a partir do primeiro aminoácido codificado pelo gene correspondente até o último aminoácido. A identidade das seqüências de extensão total é medida usando programa de alinhamento global de Needleman-Wunsch no pacote de programa EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice et al., 2000), versão 3.0.0, com os seguintes parâmetros: EMBLOSUM62, penalidade de Gap de 10,0, penalidade de Extensão de 0,5. O algoritmo é descrito em Needleman e Wunsch (1970). A
10 pessoa versada na técnica está ciente do fato que resultados usando o algoritmo de Needleman-Wunsch são comparativos somente ao alinhar domínios correspondentes da seqüência. Conseqüentemente comparação de, por exemplo, seqüências de celulase incluindo CBD ou seqüências de sinalização com seqüências carecendo destes elementos são excluídas como não sendo significativas.

20 De acordo com uma modalidade da invenção a proteína de fusão contém um núcleo de endoglucanase codificado por um gene equivalente àquele incluído em *E. coli* DSM 17326. Preferencialmente, a proteína de fusão é codificada por um gene de fusão equivalente ao incluído em *E. coli* DSM 18159. "Equivalente" conforme usado aqui, neste requerimento de pa-
25 tente, significa essencialmente similar ou similar. De acordo com uma modalidade específica da invenção a proteína de fusão contém um núcleo de endoglucanase compreendendo a seqüência de SEQ ID NO:2 e um encadeador e CBD compreendendo a seqüência de SEQ ID NO: 15. Especialmente compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou 6, ou uma
30 variante ou fragmento da mesma tendo atividade de celulase e atividade de ligação de celulose.

Um "fragmento" é entendido como sendo parte de uma seqüên-

cia de aminoácidos específica que é suficientemente longa para ter a atividade biológica desejada. Em outras palavras o fragmento pode ser, por exemplo, somente a parte madura da seqüência de aminoácidos ou ainda uma subsequência da parte madura. Por uma seqüência de aminoácidos que é uma "variante" de uma seqüência de aminoácidos específica se indica uma seqüência de aminoácidos que não é idêntica à seqüência de aminoácidos específica, mas ao invés contém no mínimo algumas alterações de aminoácidos, isto é, eliminações, substituições, inversões, inserções e etc. que não afetam essencialmente a atividade biológica da proteína comparada com uma atividade similar da seqüência de aminoácidos específica, quando usada para o fim desejado. Atividade biológica neste contexto portanto refere-se uma atividade de celulase, atividade de ligação de celulose ou ambas.

A proteína de fusão da invenção pode ser preparada ficando a parte do núcleo de endoglucanase ao encadeador e parte de CBD no DNA codificante apropriado usando técnicas de DNA recombinante conhecidas de modo geral para produzir a proteína recombinante desejada. Em resumo, os polinucleotídeos codificando os parceiros de fusão são amplificados e clonados, nucleotídeos também podem ser sintetizados. O polinucleotídeo fundido é inserido em um vetor de expressão, transformado em uma célula hospedeira e expressado. Preferencialmente, o encadeador e CBD é fixado no C-término do núcleo de endoglucanase.

Um "vetor de expressão" é um plasmídeo ou vetor de clonagem capaz de expressar DNA codificando as proteínas de fusão de endoglucanase depois de transformação em um hospedeiro desejado. Quando se usa um hospedeiro fúngico, o gene de interesse é preferencialmente proporcionado a um hospedeiro fúngico como parte de um veículo de clonagem ou expressão que integra no cromossoma fúngico, ou permite que o gene de interesse integre no cromossoma do hospedeiro. Outras seqüências que são parte do veículo de clonagem ou veículo de expressão também podem ser integradas com o DNA referido durante o processo de integração. Além disso, em fungos o vetor de expressão ou partes do mesmo podem ser direcionado/as para dentro de loci predeterminados. Alternativamente, o gene de fusão de-

sejado é proporcionado como um plasmídeo replicando autonomamente.

O DNA codificando as proteínas de fusão de endoglucanase é preferencialmente colocado sob o controle de (isto é, encadeado operavelmente a) algumas seqüências de controle tais como seqüências promotoras proporcionadas pelo vetor. Na transformação estas seqüências de controle integram no genoma hospedeiro com o gene de interesse. Alternativamente, as seqüências de controle podem ser aquelas no sítio de integração.

As seqüências de controle de expressão de um vetor de expressão variarão dependendo de se o vetor é designado para expressar um determinado gene em um hospedeiro procariótico ou em um eucariótico (por exemplo, um vetor de vaivem pode proporcionar um gene para seleção em hospedeiros bacterianos). As seqüências de controle de expressão podem conter elementos regulatórios transcricionais tais como promotores, elementos reforçadores, e seqüências de terminação transcripcional, e/ou elementos regulatórios transcricionais, tais como sítios de iniciação e de terminação translacional.

Diz-se que uma molécula de polinucleotídeo, tal como DNA, é capaz de expressar um polipeptídeo, se contiver seqüências de controle de expressão, as quais contêm informação regulatória transcripcional e as seqüências referidas são ligadas operavelmente à seqüência de nucleotídeos, a qual codifica o polipeptídeo.

Uma ligação operável é uma ligação na qual uma seqüência é conectada a uma seqüência regulatória (ou seqüências) de modo tal a por a expressão da seqüência sob a influência ou o controle da seqüência regulatória. Diz-se que duas seqüências de DNA (tais como uma seqüência de região promotora encadeada à extremidade 5' da seqüência codificando proteína) são encadeadas operavelmente se a função do promotor resulta na transcrição.

Os vetores da invenção podem compreender adicionalmente outros elementos regulatórios encadeados operavelmente, tais como seqüências reforçadoras.

Em uma modalidade preferencial, são construídos transforman-

tes geneticamente estáveis, por meio dos quais o DNA codificando as proteínas de fusão é integrado no cromossoma hospedeiro por transformação com um vetor, o qual pode portar seqüências promovendo integração do referido vetor no cromossoma.

- 5 Células que têm DNA estavelmente integrado codificando as proteínas de fusão de endoglucanase em seus cromossomas podem ser selecionadas, por exemplo, por um ou mais marcadores introduzidos, homólogos ou heterólogos, os quais possibilitam seleção de células hospedeiras as quais contêm o vetor de expressão no cromossoma, por exemplo, o mar-
- 10 cador pode proporcionar resistência a biocida, por exemplo, resistência a antibióticos, ou metais pesados, tais como cobre, ou marcadores complementando uma mutação auxotrófica no cromossoma hospedeiro, e semelhantes. O marcador selecionável pode ser, por exemplo, um gene de seleção diretamente encadeado às seqüências genéticas de DNA a serem ex-
- 15 pressadas, ou introduzido na mesma célula por co-transformação. Também podem ser usados outros sistemas de seleção.

Uma vez que o vetor de expressão contendo o DNA codificando a proteína de fusão é preparado, é introduzido em uma célula hospedeira apropriada por qualquer um de uma variedade de meios adequados, incluindo

20 transformação conforme de conhecimento na técnica. Depois de transformação, células receptoras são cultivadas em um meio seletivo apropriado, 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 hospedeiros fúngicos

25 *Trichoderma* (patente européia EP Nº 244 234), ou *Aspergillus*, tais como *A. oryzae* ou *A. niger* (publicação de patente internacional Nº WO 97/08325 e publicação de patente internacional Nº WO 95/33386, Patente U.S. Nº 5.843.745, Patente U.S. Nº 5.770.418), ou o sistema de produção desenvolvido para *Fusarium*, tais como *F. oxysporum* (Malardier et al.,

30 1989). Sistemas de produção adequados desenvolvidos para bactérias incluem um sistema de produção desenvolvido para *Bacillus*, por exemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* ou para *E. coli*, ou para um ac-

tinomycete *Streptomyces*. Sistemas de produção adequados desenvolvidos para leveduras são sistemas desenvolvidos para *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces* ou *Pichia pastoris*. Também são possíveis sistemas de produção em outros micróbios ou em células mamíferas ou em plantas.

- 5 Expressão de uma ou mais seqüências genéticas clonadas resulta na produção da proteína desejada, ou na produção de um fragmento desta proteína. Esta expressão pode ocorrer em uma maneira contínua nas células transformadas, ou em uma maneira controlada.

- 10 Para obter as preparações enzimáticas da invenção, os hospedeiros tendo as propriedades desejadas (isto é, hospedeiros capazes de expressar quantidades economicamente viáveis das proteínas de fusão de endoglucanase) são cultivados sob condições adequadas, e as enzimas desejadas são preferencialmente secretadas a partir dos hospedeiros no meio de cultura, e opcionalmente recuperadas do referido meio de cultura por métodos conhecidos na técnica. Preferencialmente o hospedeiro para semelhante
- 15 produção é um fungo filamentoso, tal como *Trichoderma* ou *Aspergillus*, e especialmente *T. reesei*.

- 20 Conforme usado no presente contexto a "preparação enzimática" refere-se a qualquer produto enzimático, o qual contém no mínimo uma proteína de fusão de endoglucanase da invenção. Portanto, uma preparação enzimática semelhante pode ser um meio de cultura gasto ou filtrado. Meio de cultura gasto significa o meio de cultura do hospedeiro compreendendo as enzimas produzidas. Preferencialmente, as células hospedeiras são separadas do referido meio depois da produção. Caso desejado, as preparações referidas podem ser liofilizadas ou a atividade enzimática de modo diverso concentrada e/ou estabilizada para armazenamento. Caso requerido,
- 25 uma enzima desejada pode ser adicionalmente purificada de acordo com métodos convencionais, tais como extração, precipitação, cromatografia, cromatografia por afinidade, eletroforese, ou semelhantes.

- 30 No entanto, é uma vantagem da invenção que o meio de cultura com ou sem células hospedeiras possa ser utilizado como uma preparação enzimática como tal sem purificação adicional, porque as proteínas de fusão

de endoglucanase podem ser secretadas no meio de cultura, e apresentam atividade nas condições ambiente do meio de cultura gasto. As preparações enzimáticas são muito econômicas de proporcionar e usar, devido a ser desnecessário o isolamento de uma enzima específica do meio de cultura.

5 Além da proteína de fusão de endoglucanase, as preparações enzimáticas podem compreender uma ou mais enzimas diferentes, as quais podem ser, por exemplo, outras celulasas, amilases, lipases, proteases, he-
micelulasas, xilanases, pectinases e/ou oxidases tais como lacases e pero-
xidases. Alternativamente, antes, durante ou depois do tratamento com a
10 proteína de fusão de endoglucanase pode ser realizado outro tratamento enzimático. O tratamento enzimático pode compreender, por exemplo, um ou mais tratamentos com amilase (por exemplo, para desengomagem do de-
nim), um ou mais tratamentos com celulase e/ou um ou mais tratamentos com peroxidase e/ou lacase. Depende da aplicação quais outras enzimas
15 são incluídas na preparação enzimática ou usadas no tratamento enzimático.

Além da proteína de fusão, a preparação enzimática pode conter aditivos, tais como estabilizantes, tampões, conservantes, tensoativos e/ou componentes do meio de cultura. Aditivos preferenciais são semelhantes, os
20 quais são comumente usados em preparações enzimáticas pretendidas para a aplicação, onde a preparação enzimática é usada.

As preparações enzimáticas podem ser proporcionadas como um líquido ou como um sólido, por exemplo, como um pó seco ou granular, especialmente grânulos não-empoeirantes, ou um líquido estabilizado. É
25 previsto que as preparações enzimáticas podem ser adicionalmente enriquecidas, ou tornadas parcialmente ou completamente deficientes em atividades enzimáticas específicas, de modo a satisfazer os requisitos de uma utilidade específica em várias aplicações, por exemplo, na indústria têxtil. Uma mistura de atividades enzimáticas secretadas por um hospedeiro pode
30 ser vantajosa em uma aplicação industrial em particular, por exemplo, em bioacabamento e bioesmerilhamento.

As proteínas de fusão de endoglucanase e as preparações das

mesmas são úteis, por exemplo, na indústria têxtil, de ração, de óleos vegetais, de detergentes, e de polpa e papel. Podem ser usadas para tratar qualquer material celulósico, tal como material têxtil, plantas usadas em ração animal, material vegetal para extração de óleo, ou polpa mecânica ou química ou fibra secundária derivada de madeiras. Também podem ser adicionadas em detergentes, os quais normalmente contêm auxiliares, tais como agentes ativos na superfície, tensoativos, agentes alvejantes e/ou construtores. No presente contexto "material celulósico" refere-se a qualquer material compreendendo celulose ou derivados da mesma como um componente significativo. O material celulósico é contactado com uma quantidade eficaz da proteína de fusão sob condições adequadas, tais como pH e temperatura apropriados, e a reação é deixada para continuar por um tempo suficiente para a reação enzimática ocorrer.

As enzimas de fusão são especialmente úteis no tratamento de materiais têxteis, tais como tecidos e roupas. O material têxtil pode ser fabricado de fibras contendo celulose natural ou fibras contendo celulose sintética ou misturas das mesmas, ou uma combinação de fibras sintéticas e fibras contendo celulose. Preferencialmente, o material contendo celulose é algodão, especialmente denim. Por "denim" se indica, em relação com esta invenção, tecido de denim, geralmente roupas de denim, particularmente jeans. Vantajosamente o denim é denim tingido com Índigo. Denim também pode ser tratado com derivados de Índigo ou com Índigo junto com algum outro corante, por exemplo, denim tingido com Índigo com fundo de enxofre.

As endoglucanases de fusão são especialmente úteis em bio-esmerilhamento e bioacabamento de têxteis.

A lavagem à pedra tem três etapas: desengomagem, abrasão e pós-tratamento. A primeira etapa, o processo de desengomagem é normalmente o primeiro tratamento a úmido do jeans e significa remoção de amido e outros agentes de engomagem geralmente aplicados aos fios de urdidura para prevenir dano durante o processo de tecitura. Alfa-amilases são usadas para remover agentes de engomagem à base de amido para processamento a úmido aprimorado e uniforme. Depois de desengomar os jeans são

normalmente enxaguados com água ou passados diretamente para a etapa de abrasão.

5 A segunda etapa, abrasão, pode ser realizada com enzimas ou pedras-pomes ou ambas. Em todos os casos é necessária ação mecânica para remover o corante, e o tratamento é geralmente realizado em máquinas de lavar roupa, como lavadoras de tambor. O termo "desgastado" significa o aspecto do tecido de denim, quando foi tratado por enzimas celulase ou pedras, ou ambas. Expressões sinônimas são lavado à pedra ou "aspecto usado". Em consequência de remoção desigual do corante há contrastes entre

10 áreas tingidas e áreas das quais o corante foi removido.

A abrasão é geralmente seguida pela terceira etapa, pós-tratamento que inclui etapas de lavagem e enxágüe durante as quais podem ser usados detergentes, abrillantadores óticos, agentes alvejantes ou amaciantes. Depois do tratamento enzimático a reação deve ser interrompida de

15 modo a prevenir dano dos materiais tratados, por exemplo, pela temperatura e/ou inativação do pH, o último compreendendo uma enxágüe completo e/ou lavagem de detergente. Isto assegura que a resistência mecânica da fibra não é adicionalmente comprometida pela presença contínua da enzima.

Conforme usado no presente contexto a expressão "bioesmerilhamento" de tecido ou roupa significa o uso de enzimas ao invés de, ou além de, pedras-pomes para o tratamento de tecido ou roupa, especialmente denim.

20

Conforme determinado acima, tratamento com celulase pode substituir completamente tratamento com pedras-pomes (por exemplo, 1 kg

25 de enzima comercial vs. 100 kg de pedras). No entanto, tratamento com celulase também pode ser combinado com tratamento com pedras-pomes, quando se deseja produzir um acabamento fortemente desgastado. Um efeito de pele de pêssago no qual se cria uma fina cobertura semelhante a pêlos se projetando também é obtido por uma lavagem combinando uma celulase

30 neutra com pedras-pomes. As proteínas de fusão descritas são especialmente úteis para proporcionar de modo eficaz um aspecto desgastado e para minimizar a repigmentação em bioesmerilhamento.

Bioesmerilhamento é tipicamente realizado em cerca de pH 3.0 a 8.0, e preferencialmente em pH 5.0 a 7.0. A temperatura da reação pode variar de cerca de 30°C a 80°C e é preferencialmente entre 50 a 60°C. A proporção de solução (a proporção do volume de líquido por peso de tecido) pode variar de cerca de 3:1 a 20:1, preferencialmente 5:1 a 10:1. O tempo de tratamento pode variar entre 15 min a 90 min e preferencialmente 30 min a 60 min. Deve ser enfatizado que a dosagem enzimática depende grandemente do tipo dos tecidos, maquinaria, condições do processo (pH, temperatura, proporção de solução, tempo de tratamento, carga de denim, escala do processo) e do tipo de preparação enzimática e semelhantes. Caso desejado, pedras-pomes podem ser usadas em combinação com as proteínas de fusão de endoglucanase. A dosagem enzimática requerida será então significativamente menor. Uma pessoa versada na técnica é capaz de definir dosagens e condições adequadas.

As proteínas de fusão de endoglucanase da presente invenção proporcionam vantagens inesperadas em que a performance enzimática é elevada e o retrotingimento é baixo resultando em contraste muito bom. Além disso, as proteínas de fusão são facilmente fabricadas, e podem ser usadas em uma faixa relativamente ampla de temperatura e pH.

Além disso, as proteínas de fusão de endoglucanase são úteis em bioacabamento de tecidos e roupas. "Bioacabamento" refere-se ao uso de enzimas em uma hidrólise controlada de fibras celulósicas de modo a modificar a superfície do fio ou tecido em uma maneira que evita permanentemente a formação de bolinhas, melhora o manuseio do tecido como maciez e lisura, clareia a estrutura superficial reduzindo o esfiapamento, o que resulta em clarificação das cores, melhora a drapabilidade do tecido, melhora a absorvência de umidade e que pode melhorar também a tingibilidade.

Depilling enzimático pode ser realizado em qualquer estágio durante processamento a úmido de têxteis, preferencialmente depois de opcional desengomagem e/ou branqueamento, e podem ser usadas condições similares como em bioesmerilhamento.

As proteínas de fusão de endoglucanase possuindo também ati-

vidade de betaglucanase, hemicelulase ou xilanase são adicionalmente úteis para melhorar a qualidade de ração animal, por meio do que material vegetal é tratado com as enzimas.

Amido, proteínas e lipídeos podem ser facilmente degradados pelo sistema digestivo de animais monogástricos tais como aves domésticas e porcos, ao passo que a principal parte de polissacarídeos não amido (NSP) incluindo beta-glucanos misturados-encadeados de, por exemplo, cevada e aveia permanecem intactas devido à falta de semelhantes atividades enzimáticas dentro do animal. Além disso, a digestibilidade de outros componentes, particularmente gorduras animais, é reduzida na presença de NSP.

Beta-glucanases têm sido usadas comercialmente para aliviar problemas causados por beta-glucanos misturados-encadeados de cevada e aveia. Betaglucanases são conhecidas para reduzir a viscosidade intestinal causada por betaglucanos solúveis bem como para liberar nutrientes encapsulados por paredes celulares ricas em beta-glucanos. O uso de beta-glucanases melhora a performance animal, a qual pode ser vista como aumento do ganho de peso e da proporção de conversão da ração. Além disso, são tipicamente reduzidas as incidências de excrementos viscosos em aves domésticas.

Peletização a vapor é a principal tecnologia de processamento de ração em todo o mundo. Suas vantagens em relação à produção de rações de farelo ensopado incluem manuseio mais fácil, redução de organismos e substâncias tóxicas, e acima de tudo aumentada eficiência da ração. A termotolerância e alta performance das proteínas de fusão descritas aqui, neste requerimento de patente, as tornam adequadas para aplicações de ração.

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos não limitantes. No entanto, deve ser entendido que as modalidades dadas na descrição acima e nos exemplos são para fins ilustrativos somente, e que são possíveis várias alterações e modificações dentro do âmbito da invenção.

Exemplo 1. Produção de celulase ALK04242 EG28 de *Thermoascus auranti-*

tiacus em *Trichoderma reesei*

Métodos de biologia molecular de rotina foram usados no isolamento e tratamentos enzimáticos de DNA (plasmídeos, fragmentos de DNA), em transformações de *E. coli*, e etc. Os métodos básicos usados são descritos nos manuais de biologia molecular de rotina, por exemplo, Sambrook et al. (1989) e Sambrook e Russell (2001).

O gene de *Thermoascus aurantiacus* *ce/5A* (SEQ ID NO: 1) codificando celulase EG28 (SEQ ID NO: 2) foi amplificado por PCR diretamente a partir do DNA genômico de *T. aurantiacus* ALK04242, isolado pelo método de Raeder e Broda (1985). Os iniciadores dianteiro (SEQ ID NO: 9) e reverso (SEQ ID NO: 10) foram designados com base na sequência de endoglucanase de *T. aurantiacus* publicada (AF487830). O produto de 1,3 kb amplificado contendo o gene exato (do códon de START para STOP) foi clonado como um fragmento *SacII-PstI* no vetor pBluescript II KS+. Dois clones independentes foram seqüenciados e um clone foi selecionado e designado como pALK1926. O número de depósito da cepa de *E. coli* contendo pALK1926 na coleção de cultura Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH é DSM 17326.

Um plasmídeo de expressão (pALK1930, Fig. 1) foi construído para produção de celulase EG28/Cel5A de *T. aurantiacus* recombinante (SEQ ID NO: 2). O gene *ce/5A*, incluindo sua própria sequência de sinal, foi exatamente fundido ao promotor de *T. reesei* *cbhl* (*cel7A*) por PCR. O gene promotor *cbhl*, terminador *cbhl* e marcador *amdS* foram incluídos conforme descrito em Paloheimo *et al.* (2003). O cassete de expressão linear (Fig. 1) foi isolado da espinha dorsal do vetor por digestão por enzima de restrição, transformado em *T. reesei* A96, e transformantes foram selecionados com acetamida como única fonte de nitrogênio. A cepa hospedeira carece de quatro celulasas endógenas principais: CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B e EGII/Cel5A. Transformações foram realizadas de acordo com Penttilä *et al.* (1987) com as modificações descritas em Karhunen *et al.* (1993). Os transformantes foram purificados sobre placas de seleção através de conídios únicos antes de os esporular sobre PD.

A produção de celulase dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes da cultura de culturas de frasco agitado (50 ml). Transformantes foram cultivados por 7 dias em um meio indutor de complexo celulósico (Joutsjoki *et al.* 1993) tamponado com 5% de KH_2PO_4 em pH 5.5. A atividade enzimática da proteína recombinante foi medida a partir do sobrenadante da cultura como a liberação de açúcares redutores de carboximetilcelulose (2% de CMC) a 50°C em tampão Sitrato a 50 mM pH 4.8 essencialmente conforme descrito por Bailey e Nevalainen 1981; Haakana *et al.* 2004. A atividade contra beta-glucano de cevada (1%) também foi determinada medindo a liberação de açúcares redutores a 50°C em tampão de acetato a 50 mM pH 4.8 conforme descrito por Stålbrand *et al.* 1993. Produção da proteína recombinante também foi detectada a partir do sobrenadante da cultura por eletroforese por gel de poliacrilamida SDS. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por *Southern blotting* usando o cassete de expressão como uma sonda.

O pH ótimo da celulase Ta EG28/Cel5A produzida heterologicamente foi determinado no tampão de Mcllvaine universal dentro de uma faixa de pH de 4.0 a 8.0 usando carboximetilcelulose como substrato. Conforme mostrado na Figura 2A o pH ótimo para atividade de celulase EG28/Cel5A é em pH 6.0. A temperatura ótima para a atividade enzimática de celulase EG28/Cel5A foi determinada para ser 75°C (Figura 2B).

O transformante escolhido (RF6188) foi cultivado em um biorreator para obter material para os testes de aplicação (vide o Exemplo 4).

Exemplo 2. Produção da proteína de fusão recombinante de *Thermoascus aurantiacus* ALK04242 EG28+CtCBD

Para produzir uma proteína de fusão EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante (SEQ ID NO: 4), o domínio de ligação de celulose (CBD) da celulase CBHI/Cel7A de *Chaetomium thermophilum* ALK04265 foi encadeado à celulase EG28/Cel5A. O constructo contém o domínio catalítico de EG28 (aminoácidos 1-334 do polipeptídeo de extensão total) ficado à região encadeadora e CBD de *C. thermophilum* CBHI/ Cel7A CtCBD (SEQ ID NO: 15).

Métodos de biologia molecular de rotina foram usados conforme descrito no Exemplo 1. Primeiro, um único sítio de restrição *SnaBI* próximo à extremidade de C-terminal da sequência EG28/Cel5A foi introduzido por PCR. Isto possibilita fusão direta de qualquer DNA "blunt-ended" depois do aminoácido Y334 do polipeptídeo EG28/Cel5A. O encadeador e região CBD do gene codificando CBHI/Cel7A de *C. thermophilum* (ce/7A, SEQ ID NO: 7) foi amplificado por PCR usando iniciadores dianteiro (SEQ ID NO: 11) e reverso (SEQ ID NO: 12) e DNA genômico de *C. thermophilum* ALK04265 como modelo. O produto de 1,6 kb amplificado foi ligado ao gene ce/5A (depois de Y334) para criar Ta ce/5A Ct ce/7AlinkerCBD (SEQ ID NO: 3). O plasmídeo resultante foi designado como pALK1946. O número de depósito da cepa de *E. coli* contendo pALK1946 na coleção de cultura Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH é DSM 18159.

Um plasmídeo de expressão (pALK1948, Fig 1) para produção da celulase EG28+CtCBD foi construído conforme descrito no Exemplo 1. O cassete de expressão de 8,9 kb linear (Figura 1) foi isolado da espinha dorsal do vetor por digestão por enzima de restrição *NotI*, transformado em *T. reesei* A33 (a cepa tem os genes codificando as quatro celulases principais CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B e EGII/Cel5A eliminados), e transformantes selecionados conforme descrito no Exemplo 1. O pH e temperatura ótimos da proteína de fusão foram determinados para serem os mesmos que os da proteína EG28 selvagem.

O transformante escolhido (RF6377) foi cultivado em um biorreator para obter material para os testes de aplicação (vide os Exemplos 5 a 10).

Exemplo 3. Produção da proteína de fusão recombinante de *Acremonium thermophilum* ALK04245 EG40+CtCBD

Para produção de uma proteína de fusão EG40+CtCBD de *Acremonium thermophilum* ALK04245 recombinante (SEQ ID NO: 6), o domínio de ligação de celulose de celulase EG40 é substituído com o da CBHI/Cel7A de *Chaetomium thermophilum* ALK04265. O constructo contém o domínio catalítico da celulase EG40 (aminoácidos 1 a 234 do polipeptídeo

de extensão total) fixado à região encadeadora e CBD de CBHI/Cel7A de *C. thermophilum* (CtCBD, SEQ ID NO: 15).

Métodos de biologia molecular de rotina são usados conforme descrito no Exemplo 1. O gene *ce/45A* de *Acremonium thermophilum* (SEQ ID NO: 8) é amplificado por PCR a partir do DNA genômico ALK04245 de *A. thermophilum* usando os iniciadores (SEQ ID NO: 13) e (SEQ ID NO: 14). O fragmento de PCR de 1,1 kb é clonado como um fragmento *SacII-PstI* no vetor pBluescript II KS+. Depois disso, um único sítio de restrição *NruI* próximo à extremidade de C-terminal da sequência EG40 é introduzido por PCR. Isto possibilite fusão direta de qualquer DNA blunt-ended depois do aminoácido S234 do polipeptídeo EG40. O encadeador mais região CBD da celulase CBHI/Cel7A de *Chaetomium thermophilum* (*ce17A*) é amplificado por PCR conforme descrito no Exemplo 2 e um fragmento de restrição do mesmo é ligado ao gene *ce/45A* (depois de S234) para criar *At ce/45A_Ct cef7AlinkerCBD* (SEQ ID NO: 5). Um plasmídeo de expressão para produção da celulase EG40+CtCBD é construído e a proteína recombinante (SEQ ID NO: 6) é produzida em *Trichoderma* conforme descrito no Exemplo 1.

Exemplo 4. Performance de celulase EG28 em acabamento de denim em diferentes temperaturas

Celulase EG28 de *Thermoascus aurantiacus* produzida em *Trichoderma* (cepa RF6188) conforme descrito no Exemplo 1 foi testada para sua capacidade para criar um aspecto desgastado similar ao proporcionado por pedras-pomes em bioesmerilhamento de denim em diferentes temperaturas. Uma enzima de acabamento de denim eficiente, uma preparação de celulase ácida enriquecida com EGII comercial produzida em *Trichoderma* (Patente U.S. Nº 5.874.293) foi usada como uma referência.

Jeans feitos de sarja de denim tingido com Índigo foram usados como material de teste depois de desengomagem com alfa-amilase ECOS-TONE® A200. Os tratamentos com celulase foram realizados com lavadora-extratora Electrolux's Wascator FOM 71 CLS sob condições descritas na Tabela 1.

A atividade de endoglucanase (ECU) das preparações enzimáti-

cas usadas foi medida como a liberalão de açúcares redutores de hidroxietil celulose conforme previamente descrito (Bailey e Nevalainen, 1981). O concentrado enzimático enriquecido com EGII e a preparação de EG28 foram dosados a 220 ECU/g e cerca de 380 ECU/g de tecido, respectivamente. As enzimas foram testadas em sua faixa de pH ótimo, a preparação de EGII em pH 5 e a preparação de EG28 em pH 6. Depois de drenagem, a enzima foi inativada (por 10 minutos a 40°C) aumentando o pH acima de 11 com hidróxido de sódio. Os jeans foram então ensaguados três vezes com água e secados em uma secadora de tambor.

O efeito de bioesmerilhamento / nível de abrasão foi avaliado medindo a cor como valores de reflectância com um espectrofotômetro Minolta CM 2500 usando as coordenadas de espaço de cor L*a*b* (iluminante D65/ 2°). A cor da face e do lado reverso do denim e dos bolsos foi medida depois de desengomagem (isto é, antes do tratamento com celulase) e depois do tratamento com celulase. Cada medição sobre o lado de face, lado reverso ou bolsos foi a média de 40, 20, ou 12 medições aproximadas, respectivamente. Dois pares de jeans foram usados em cada teste e o resultado final foi a média das mesmas. Os resultados são mostrados na Tabela 2 e na Figura 3.

Tabela 1. Condições de teste / parâmetros do processo usados em tratamentos com celulase.

Parâmetros do processo	
Carga de denim	1,3 kg
Água	19 litro
pH controle (pH 5 - 5,3)	35 g de Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O + 22 g de ácido cítrico
pH controle (pH 6,1 - 6,3)	35,5 g de Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O + 15 g de ácido cítrico
Tempo	45 min
Temperatura	40, 50, 60 ou 70°C
Dosagem de celulase	220 ou cerca de 380 ECU/g de tecido

Tabela 2. Medições da cor de denim tratado com celulase EG28 em diferentes temperaturas.

Como referência foi usado tratamento com preparação enrique-

cida de EGII. L* indica a luminosidade, -b* é a direção do azul, +b* é a direção do amarelo.

Prepara- ção enzi- mática	E- CU/g de roupa	Condições	Antes de tra- tamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		del- taL*	del- tab*
			L*	b*	L*	b*		
Lado de face:								
EG28	380	70°C, pH 6,1 - 6,3	23,67	-16,07	32,63	-16,94	8,96	-0,87
EG28	370	60°C, pH 6,1 - 6,3	23,67	-16,38	31,94	-17,09	8,27	-0,71
EG28	380	50°C, pH 6,1 - 6,3	23,62	-16,24	31,91	-16,86	8,30	-0,63
EG28	380	40°C, pH 6,1 - 6,3	23,75	-16,07	30,57	-17,32	6,82	-1,25
EGII enri- quecida	220	60°C, pH 5,2 - 5,3	23,45	-16,10	32,90	-17,29	9,46	-1,19
Lado re- verso:								
EG28	380	70°C, pH 6,1 - 6,3	49,76	-6,95	49,60	-10,43	-0,16	-3,48
EG28	370	60°C, pH 6,1 - 6,3	49,55	-6,87	50,78	-9,57	1,24	-2,71
EG28	380	50°C, pH 6,1 - 6,3	49,92	-7,05	50,49	-9,83	0,57	-2,78
EG28	380	40°C, pH 6,1 - 6,3	49,89	-6,93	49,73	-9,73	-0,16	-2,80
EGII enri- quecida	220	60°C, pH 5,2 - 5,3	49,75	-6,82	48,28	-12,26	-1,47	-5,45
Bolsos:								
EG28	380	70°C, pH 6,1 - 6,3	77,40	-8,14	68,53	-12,60	-8,86	-4,47
EG28	374	60°C, pH 6,1 - 6,3	77,91	-7,71	70,29	-12,34	-7,62	-4,63
EG28	380	50°C, pH 6,1 - 6,3	78,11	-7,62	70,63	-12,02	-7,49	-4,40
EG28	380	40°C, pH 6,1 - 6,3	77,51	-7,60	70,47	-11,91	-7,04	-4,32
EGII enri- quecida	220	60°C, pH 5,2 - 5,3	77,46	-7,68	66,18	-14,17	-11,29	-6,49

Os resultados na Tabela 2 e na Fig. 3 mostram que o melhor efeito de abrasão com a preparação EG28 (cepa RF6188) foi obtido na faixa

de 50 a 70°C. Usando uma dosagem de 380 ECU/g de tecido da preparação EG28 a 70°C foi obtido um nível de abrasão similar (luminosidade L*) comparado com usando a dosagem de 220 ECU/g de tecido de uma preparação enriquecida de EGII a 60°C. No entanto, o efeito de retro-pigmentação (re-
 5 deposição de corante Índigo) sobre o lado reverso do denim e bolsos foi menor com a preparação EG28 (maior luminosidade, menos azul) do que com a preparação EGII enriquecida. Além disso o contrasto sobre o lado de face do denim teve aspecto melhor.

Exemplo 5. Performance de proteína de fusão EG28+CtCBD comparada
 10 com celulase EG28 em acabamento de denim

Proteína de fusão EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante produzida em *Trichoderma* (cepa RF6377) conforme descrito no Exemplo 2 foi comparada com a preparação EG28 da cepa RF6188 em bioesmerilhamento de denim em pH 6, 60°C. O denim e sistema de teste
 15 para bioesmerilhamento foram como no Exemplo 4, exceto que a quantidade de denim foi nivelada para 1430 g com uma peça extra de denim diferente que não foi incluída nas medições. O efeito do tratamento com celulase foi avaliado como no Exemplo 4.

Os resultados na Tabela 3 mostram que o efeito de bioesmeri-
 20 lhamento da preparação EG28+CtCBD foi muito bom em uma baixa dosagem. Com a cepa RF6377 foi obtido um nível de abrasão similar (luminosidade L*) com dosagem 6,5 vezes menor comparada com RF6188. O encadeamento do domínio de ligação de celulose (CBD) a celulase EG28 não aumentou o efeito de retropigmentação indesejável, mas aumentou muito a performance
 25 de lavagem desejada.

Tabela 3. Medições da cor de denim tratado com celulasas EG28 e EG28+CtCBD a 60°C, pH 6.

L* indica a luminosidade, -b* é a direção do azul, +b* é a direção do amarelo.

Prepara- ção enzi- mática	ECU/g de roupa	Antes de tratamen- to com celulase		Depois de trata- mento com celu- lase		deltaL*	deltab*
		L*	b*	L*	b*		
Lado de face:							
EG28	325	23,40	-16,02	31,01	-17,12	7,62	-1,10
EG28+CtC BD	50	23,81	-16,21	31,60	16,92	7,80	-0,71
Lado re- verso:							
EG28	325	49,46	-6,83	50,03	-9,62	0,57	-2,79
EG28+CtC BD	50	49,36	-7,03	50,62	-9,61	1,27	-2,58
Bolsos:							
EG28	325	76,11	-8,36	68,53	-12,46	-7,58	-4,10
EG28+CtC BD	50	76,02	-8,45	68,81	-12,39	-7,21	-3,94

Exemplo 6. Performance de celulase EG28+CtCBD comparada com celulase EGII em acabamento de denim

- 5 Proteína de fusão EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante produzida em *Trichoderma* (cepa RF6377) foi comparada com a preparação de celulase ácida enriquecida EGII comercial (Patente Nº U.S. 5.874.293) em bioesmerilhamento de denim.

10 O sistema de teste para bioesmerilhamento foi como no Exemplo 4, exceto que foram usadas peças (pernas) de vários tipos de Denim diferentes da Ukos Sport (Bélgica) e Vicunha (Brasil) (total de 1,2 kg). As condições para tratamento com EG28+CtCBD e EGII foram como na Tabela 4. O efeito do tratamento com celulase foi avaliado como no Exemplo 4.

Os resultados dos experimentos realizados com quatro tecidos de denim diferentes são mostrados nas Tabelas 4 e 5. Usando uma dosa-

- gem enzimática de 500 ECU/g de tecido de preparação EG28+CtCBD foi obtido um nível de luminosidade similar comparado com o uso de uma dosagem de 1000 ECU/g da preparação enriquecida com EGII. A performance da preparação EG28+CtCBD necessitou em torno de somente metade da
- 5 atividade de ECU daquela da celulase enriquecida com EGII. Além disso, o meio de cultura de EG28+CtCBD produzida pelo hospedeiro recombinante é volumetricamente cerca de duas vezes mais tão eficaz quanto o do hospedeiro recombinante produtor de EGII em bioesmerilhamento. Foi observado
- 10 consideravelmente menos retropigmentação sobre o lado reverso do denim quando foi usada a preparação EG28+CtCBD. A performance da preparação EG28+CtCBD a 50°C foi melhor em pH 6 do que em pH 5.

Tabela 4. Medições da cor sobre o lado da face de denim tratado com celulase EG28+CtCBD em pH 5 e 6. Tratamento com preparação enriquecida com EGII foi usado para comparação. L* indica a luminosidade, -b* é a direção do azul, +b* é a direção do amarelo.

15

Preparação enzimática	Denim	E-CU/g de roupa	Condições	Antes de tratamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		del-taL*	del-tab*
				L*	b*	L*	b*		
EGII Enriquecido	Atlanta, Ukos sport	1000	pH ajust. com ácido acético 55 min, 50°C, pH 5	19,96	-15,91	27,44	-18,49	7,48	-2,58
	Mathew, Ukos sport			18,28	-7,97	21,87	-11,71	3,59	-3,74
	Nostalgia, Ukos sport			19,12	-8,78	23,90	-13,50	4,78	-4,72
	Vicunha, Savana			17,24	-10,49	21,51	-14,93	4,27	-4,44
	Média			18,65	-10,79	23,68	-14,66	5,03	-3,87

Preparação enzimática	Denim	E-CU/g de roupa	Condições	Antes de tratamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		deltaL*	delta b*
				L*	b*	L*	b*		
EG28+CtC BD	Atlanta, Ukos sport	500	pH ajust. com ácido acético 55 min, 50°C, pH 5	19,79	-16,02	25,88	-18,44	6,09	-2,42
	Mathew, Ukos sport			18,07	-8,58	21,45	-11,80	3,38	-3,22
	Nostalgia, Ukos sport			19,05	-8,73	22,65	-12,69	3,60	-3,96
	Vicunha, Savana			17,38	-10,11	20,75	-14,18	3,37	-4,07
	Média			18,57	-10,86	22,68	-14,28	4,11	-3,42
EG28+CtC BD	Atlanta, Ukos sport]	500	pH ajust. com ácido acético 55 min, 50°C, pH 6	19,98	-16,18	27,35	-18,20	7,37	-2,02
	Mathew, Ukos sport			17,51	-8,84	21,40	-11,62	3,89	-2,78
	Nostalgia, Ukos sport			18,58	-8,65	22,96	-12,75	4,38	-4,10
	Vicunha, Savana			17,50	-10,16	21,49	-14,06	3,99	-3,90
	Média			18,39	-10,96	23,30	-14,16	4,91	-3,20

Tabela 5. Medições de cor sobre o lado reverso de denim tratado com celulase EG28+CtCBD em pH 5 e 6. Tratamento com preparação enriquecida com EGII foi

usado para comparação. L* indica a luminosidade, -b* é a direção do azul.

Preparação enzimática	Denim	ECU/g de roupa	Condições	Antes de tratamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		del-taL*	del-tab*
				L*	b*	L*	b*		
EGII Enri-quecida	Atlanta, Ukos sport	1000	pH ajust. com ácido acético 55 min, 50°C, pH 5	47,98	-7,25	40,18	-14,63	-7,80	-7,38
	Mathew, Ukos sport			38,41	-7,17	36,11	-10,93	-2,30	-3,76
	Nos-talgy, Ukos sport			46,70	-6,06	41,87	-11,73	-4,83	-5,67
	Vicunha, Savana			35,65	-9,24	33,48	-12,44	-2,17	-3,20
	Average			42,19	-7,43	37,91	-12,43	-4,28	-5,00
EG28+CtC BD	Atlanta, Ukos sport	500	pH ajust. com ácido acético 55 min, 50°C, pH 5	48,01	-7,29	41,82	-13,25	-6,19	-5,96
	Mathew, Ukos sport			37,60	-7,27	35,59	-10,50	-2,01	-3,23
	Nos-talgy, Ukos sport			46,79	-5,99	44,75	-9,37	-2,04	-3,38
	Vicunha, Savana			35,08	-9,48	33,72	-11,80	-1,36	-2,32
	Média			41,87	-7,51	38,97	-11,23	-2,90	-3,72

Preparação enzimática	Denim	ECU/g de roupa	Condições	Antes de tratamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		del-taL*	del-tab*
				L*	b*	L*	b*		
EG28+CtC BD	Atlanta, Ukos sport	500	pH ajust. com ácido acético 55 min, 50°C, pH 6	47,55	-7,43	42,41	-13,30	-5,14	-5,87
	Mathew, Ukos sport			37,27	-7,58	36,01	-10,27	-1,26	-2,69
	Nostalgy, Ukos sport			47,02	-6,01	44,61	-10,13	-2,41	-4,12
	Vicunha, Savana			34,84	-9,39	33,53	-11,20	-1,31	-1,81
	Média			41,67	-7,60	39,14	-11,23	-2,53	-3,62

Exemplo 7. Efeito do pH sobre a performance de preparação de celulase EG28+CtCBD a 50°C e a 60°C

5 Proteína de fusão EG28+CBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante produzida em *Trichoderma* (cepa RF6377) foi testada para sua performance em bioesmerilhamento de denim em diferentes valores de pH em 50°C e em 60°C.

10 Sarja de denim tingida com Índigo (diferente dos exemplos prévios) que foi desengomada e cortada em pedaços foi usada como material de teste. Tratamentos com celulase foram realizados em LP-2 Launder Ometer como se segue. Cerca de 7,2 g de tecido de denim (amostra de cerca de 12 cm x 12 cm), 200 ml de tampão de fosfato de citrato de Mc Ilvaine, e 90 bolas de aço (diâmetro 0,6 cm) foram carregados em recipientes de 1,2 litro. O Launder Ometer foi rodado por 120 min em diferentes valores de pH de 4 a 8 usando temperaturas de 50°C e de 60°C. Depois de remover as

amostras dos recipientes eles foram enxaguados com água e embebidas em água contendo NaOH (pH>11) por 10 min com misturação. Depois disso, as amostras foram embebidas em água quente contendo detergente líquido (OMO Color) e misturadas por 10 min, seguidos por cuidadoso enxágüe com água quente por várias vezes. As amostras foram secadas em temperatura ambiente. O efeito de bioesmerilhamento foi avaliado medindo a cor como unidades de reflectância conforme descrito no Exemplo 4. Cada valor de medição sobre o lado de face da amostra de denim foi a média de no mínimo 20 medições.

Os resultados mostrados nas Tabelas 6 e 7 e nas Figuras 4 e 5 mostram que a faixa de pH mais ótimo para a celulase EG28+CtCBD em 50° é 5.5 a 6.5 e em 60°C é 5 a 7.

Tabela 6. Medições de cor sobre o lado de face de denim tratado com celulase EG28+CtCBD em diferentes valores de pH em Launder a 50°C.

L* indica a luminosidade, -b* é a direção do azul.

Preparação enzimática	ECU/g de roupa	Condições	Antes de tratamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		Aumento de L*
			L*	b*	L*	b*	
Tampão Controle	0	pH 6	17,28	-13,07	18,77	-14,13	1,49
Tampão Controle	0	pH 8	17,01	-13,4	18,18	-14,45	1,17
EG28+CtCBD	1000	pH 4	16,79	-13,59	20,86	-16,40	4,07
EG28+CtCBD	1000	pH 5	17,34	-13,18	21,59	-16,44	4,25
EG28+CtCBD	1000	pH 5,5	17,30	-13,25	22,06	-16,39	4,76
EG28+CtCBD	1000	pH 6	17,35	-13,42	22,29	-16,47	4,94
EG28+CtCBD	1000	pH 6,5	17,31	-13,41	22,48	-16,65	5,17
EG28+CtCBD	1000	pH 7	17,34	-13,25	21,55	-16,23	4,21
EG28+CtCBD	1000	pH 8	16,91	-13,63	19,62	-15,72	2,71

Tabela 7. Medições de cor sobre o lado de face de denim tratado com celulase EG28+CtCBD em diferentes valores de pH em Launder a 60°C.

L* indica a luminosidade, -b* é a direção do azul.

Preparação enzimática	ECU/g de roupa	Condições	Antes de celulase		Depois de celulase		Aumento de L*
			L*	b*	L*	b*	
EG28+CtCBD	1000	pH 4	17,19	-13,58	20,48	-15,77	3,29
EG28+CtCBD	1000	pH 5	17,10	-13,24	22,74	-16,59	5,64
EG28+CtCBD	1000	pH 5.5	17,10	-13,54	22,66	-16,61	5,56
EG28+CtCBD	1000	pH 6	17,10	-13,65	22,83	-16,74	5,73
EG28+CtCBD	1000	pH 6.5	17,19	-13,47	22,65	-11,72	5,46
EG28+CtCBD	1000	pH 7	16,99	-13,72	22,10	-16,66	5,11
EG28+CtCBD	1000	pH 8	17,13	-13,68	19,35	-15,15	2,22
Controle Tampão	0	pH 6	17,36	-13,6	18,95	-14,28	1,59

Exemplo 8. Performance de preparação de celulase EG28+CtCBD em acabamento de denim em diferentes temperaturas

Proteína de fusão EG28+CtCBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante produzida em *Trichoderma* (cepa RF6377) conforme descrito no Exemplo 1 foi testada para sua capacidade para criar um aspecto desgastado similar ao proporcionado por pedras-pomes em bioesmerilhamento de denim em diferentes temperaturas. Enzimas de acabamento de denim eficientes, preparação de celulase ácida enriquecida com EGII comercial (patente Nº U.S. 5.874.293) e preparação de celulase neutra ECOSTONE® C1 foram usadas como referência.

O sistema de teste para bioesmerilhamento foi como no Exemplo 4, exceto que foram usados sarja de denim diferente e um tempo de lavagem de 55 min. A atividade enzimática (unidade de endoglucanase, ECU) das preparações enzimáticas enriquecidas com EG28+CtCBD e EGII foi medida como no Exemplo 4. A atividade (unidade de celulase neutra, NCU) da preparação de celulase neutra ECOSTONE® C1 foi medida como a liberação de açúcares redutores de carboximetil celulose conforme previamente descrito (Bailey e Nevalainen, 1981; Haakana et al. 2004). As preparações ECOSTONE® C1, EG28+CtCBD, ou EGII enriquecidas foram dosadas a 250 NCU/g, 500 ECU/g, ou 1000 ECU/g de tecido, respectivamente. O efeito do

tratamento com celulase foi avaliado como no Exemplo 4.

A performance de EG28+CtCBD em temperaturas de 40 a 70°C, pH 6 é mostrada na Tabela 8 e na Figura 6. A faixa de temperatura preferencial para a enzima é 50 a 70°C. Temperaturas menores como 40°C podem ser usadas para obter um efeito de abrasão com menos retirada de cor se for desejável um visual mais escuro.

Os resultados também estão de acordo com os obtidos no Exemplo 6, onde foi mostrado que a performance de EG28+CtCBD em bio-esmerilhamento era cerca de duas vezes mais eficaz do que a da preparação de celulase ácida enriquecida EGII comercial. Celulases ácidas geralmente têm uma tendência de retropigmentação. Celulases neutras, como ECOSTONE® C1, tipicamente causam baixa retropigmentação portanto resultando em bom contraste. Os resultados obtidos aqui mostram que foi obtido um efeito similar com a celulase EG28+CtCBD como com as celulases neutras (Tabela 8).

Tabela 8. Medições de cor de denim tratado com celulase EG28+CtCBD em diferentes temperaturas.

Tratamento com celulase ácida enriquecida com EGII e preparação de celulase neutra ECOSTONE® C1 foi usada como referência. L* indica a luminosidade, -b* é a direção do azul, +b* é a direção do amarelo.

Preparação enzimática	Atividade/ g de roupa	Condições	Antes de tratamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		deltaL*	deltab*
			L*	b*	L*	b*		
Lado de face:								
EG28+CBD	500 ECU/g	70°C, pH 6.2	17,38	-13,49	27,42	-17,27	10,05	-3,78
EG28+CBD	500 ECU/g	60°C, pH 6.2	16,76	-13,31	26,01	-17,49	9,25	-4,18
EG28+CBD	500 ECU/g	50°C, pH 6.2	16,78	-13,40	25,00	-17,44	8,22	-4,04
EG28+CBD	500 ECU/g	40°C, pH 6.2	16,76	-13,21	22,86	-17,25	6,11	-4,04

Preparação enzimática	Atividade/ g de roupa	Condições	Antes de tratamento com celulase		Depois de tratamento com celulase		deltaL*	deltab*
			L*	b*	L*	b*		
EGII enriquecido	1000 E-CU/g	60C°, pH 5.1	17,24	-13,38	26,59	-17,64	9,35	-4,26
ECOSTONE C1	250 NCU/g	60C°, pH 6.5	17,38	-13,53	26,91	-16,98	9,53	-3,45
Lado reverso:								
EG28+CBD	500 ECU/g	70C°, pH 6.2	45,67	-6,33	41,78	-13,83	-3,90	-7,51
EG28+CBD	500 ECU/g	60C°, pH 6.2	45,60	-5,95	42,72	-13,05	-2,88	-7,10
EG28+CBD	500 ECU/g	50C°, pH 6.2	45,67	-5,92	41,81	-13,35	-3,86	-7,44
EG28+CBD	500 ECU/g	40C°, pH 6.2	45,80	-5,72	41,66	-12,52	-4,14	-6,81
EGII enriquecido	1000 E-CU/g	60C°, pH 5.1	46,10	-6,19	39,89	-15,24	-6,21	-9,06
ECOSTONE C1	250 NCU/g	60C°, pH 6.5	45,63	-6,46	42,49	-12,76	-3,14	-6,31

Exemplo 9. Performance de celulases EG28 e EG28+CtCBD em bioacabamento (depilling)

Foi testada a performance da celulase EG28 da cepa RF6188 e da preparação EG28+CtCBD da cepa RF6377 em depilling de artigos de malha de algodão. Os tratamentos com celulase foram realizados com lavadora-extratora Wascator FOM 71 CLS da Electrolux sob condições descritas na Tabela 9.

Pedaços de dois tipos de suéteres de gola Polo de baixa qualidade com superfície esfiapada, feitos de tecido à base de 100% de jérsei de algodão ou estrutura feita de 95% de algodão e 5% de lycra foram usados como material de teste com material de enchimento. Primeiro, as amostras foram pré-lavadas por 10 min a 60°C com 1 ml/L de tensoativos / agentes umectantes (Sandoclean PCJ da Sandos e Imacol CN da Clariant) e enxaguadas três vezes com água. Depois disso, as malhas de algodão foram

- tratadas com celulase a 60°C por 60 minutos, na presença dos mesmos auxiliares têxteis conforme usado na pré-lavagem. A enzima foi inativada conforme descrito no Exemplo 4, exceto pela temperatura, a qual foi de 60°C durante o enxágüe alcalino. Os pedaços de artigos de malha foram enxaguados três vezes e depois disso secados na secadora de tambor.

Tabela 9. Condições de teste / parâmetros do processo usados em tratamentos de bioacabamento.

Parâmetro do processo	
Carga de tecido	1,0 kg
Água	15 litro
Sandoclean PCJ e Imacol CN	1 ml/l
Tampão / pH controle (pH 5 -5.3)	cerca de 3 ml de Ácido acético (80 %)
Tempo	60 min
Temperatura	60°C
Dosagem de celulase	1200 ECU/g de tecido

- O efeito do tratamento com celulase foi avaliado visualmente a olho nu e com uma lupa. Uma amostra pré-lavada sem enzima foi usada como controle.

- Os resultados mostraram que a preparação EG28+CtCBD aumentaram as propriedades de depilling. O esfiapamento superficial do artigo de malha foi consideravelmente reduzido depois de tratamento com a preparação EG28+CtCBD comparado com o controle (tratamento sem enzima). Além disso, a preparação EG28 teve um efeito de depilling.

Exemplo 10. Teste da estabilidade de peletização de ração

- Duas preparações de celulose, EG28 (cepa RF6188) e EG28+CtCBD (cepa RF6377) foram testadas separadamente em um experimento, o qual estimula um processo de produção de ração industrial. Antes de experimentação as preparações EG28 ou EG28+CtCBD secadas por pulverização foram trituradas com polvilho de trigo de modo a melhorar a homogeneidade no nível da ração. Enzimas EG28 ou EG28+CtCBD pré-misturadas com polvilho foram adicionadas em uma dosagem de 200 g/t e em 500 g/t de ração, respectivamente. Foi usada superdosagem enzimática para facilitar análise de amostras peletizadas em altas temperaturas, onde a

atividade pode ter sido substancialmente reduzida.

O moinho e misturador são usados para produzir misturas de farinha grossa como parte de uma planta de ração semi-industrial com uma capacidade de peletização nominal de 5 t/h. O moinho é um moinho de martelos Champion equipado com molde de $\square$ 3,0 mm. A matéria-prima triturada é misturada em um misturador horizontal de 2.500 litros a 27 rpm antes de ser transferida para a miniplanta de moagem de ração. A planta compreende um misturador horizontal (700 L de volume, velocidade de 48 rpm, lotes de mistura de 300 kg), um *dozing screw* Skjold TR e um misturador de cascata Kahl (extensão 130 cm, diâmetro 30 cm, velocidade 155 rpm, equipado com 37 palhetas ajustáveis). O tempo de pausa para 300 kg/h é aprox. 30 seg. Montada sobre o lado do misturador de cascata está uma tubulação com um descarregador de água e 3 válvulas de vapor a partir das quais o vapor é conduzido para a farinha grossa. O vapor é proporcionado por um boiler de alta pressão com uma capacidade máxima de 400 kg de vapor/h. Os testes são conduzidos com superpressão de 2 atmosferas e o vapor é conduzido através de uma válvula de redução da pressão, a qual controla a adição de vapor ao misturador de cascata. Três válvulas sobre a tubulação são usadas para fino ajustamento da temperatura da farinha grossa desejada. A temperatura da farinha grossa é medida por um termômetro digital colocado na saída do misturador de cascata, logo antes da farinha grossa entrar no molde de pélete. A prensa de pélete é um Simon Heesen, tipo labor (monorrolo) com um molde de 0,3 mm * 35 mm e um motor de 7,5 kW. Diâmetro interno do molde: 173 mm, altura do rolo de pressão: 50 mm, diâmetro do rolo de pressão: 140 mm, taxa de curso 500 rpm e capacidade nominal: 300 kg/h. As amostras são colhidas depois da prensa de pélete e resfriadas em uma caixa de refrigeração particionada com fundo perfurado, ventilador: 1500 m³ de ar/ hora.

Foi produzido um lote de 300 kg de uma ração de farelo enso- pado à base de trigo. Uma pré-mistura foi produzida a partir de 10 kg desta farinha grossa e 200 g (ou 500 g) da enzima de teste em um misturador compulsório de 70 litros. Velocidade do misturador: 45 rpm. Tempo de

mistura: 10 min. Esta pré-mistura foi adicionada com 290 kg da ração ao misturador horizontal na miniplanta de moagem de ração e foi misturada por 10 minutos. Depois de amostragem da ração de farelo ensopado, a ração foi peletizada através da prensa de pélete (molde de $\square$ 0,3 mm). A farinha grossa foi aquecida até temperatura alvo (65 a 90°C) ajustando adição de vapor ao misturador de cascata. Para cada temperatura, uma amostra foi primeiro colhida 10 minutos depois de ser obtida a temperatura de peletização alvo (conforme medida na farinha grossa logo antes da peletização). Amostras foram colhidas durante 1,0 min correspondendo a 5,0 kg de ração peletizada. A amostra foi colhida como subamostras de aproximadamente 500 gramas e colocada em uma caixa de refrigeração por 10 a 15 segundos depois das péletes terem deixado a prensa de pélete. Todas as amostras foram aeradas e resfriadas em temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram homogeneamente sub-amostradas sobre um divisor de amostras de dispositivo de calha para retenção das mesmas e preenchidas em sacos plásticos.

As amostras foram analisadas como se segue: 2,5 g de amostra bem triturada e 20 ml de tampão de acetato (0,05 M, pH 5.0) foram agitados por 30 min em temperatura ambiente, centrifugadas (10 min, 4000 rpm) e diluídas. 1,0 ml de amostra clareada em triplicata foi equilibrado por 5 min em um banho de água a 40°C. A reação foi iniciada por adição de um comprimido de Beta-Glucayzyme (Megazyme, Irlanda) sem agitação. Depois de exatamente 30 min a reação foi interrompida adicionando 5,0 ml de Trizma Base a 1% (peso/ vol) (Sigma-Aldrich) com vigorosa agitação sobre um misturador de vórtice. O tubo foi deixado em temperatura ambiente por cerca de 5 min; a pasta semifluida foi agitada de novo e filtrada através de papel-filtro Whatman 1. A absorvência do filtrado foi medida a 590 nm. Os resultados foram analisados usando uma curva padrão.

Recuperações da atividade enzimática antes e depois de peletização são apresentadas na Tabela 10. A influência da temperatura de peletização sobre a recuperação da atividade de betaglucanase também foi apresentada nas Figuras 7 e 8. As celulases EG28 e EG28+CtCBD foram es-

táveis até 80°C. A celulase EG28+CtCBD tendeu a ser mais estável do que EG28 na temperatura de peletização de 90°C.

Tabela 10. Recuperações da atividade enzimática antes (farinha grossa de misturador horizontal) e depois de peletização em temperaturas variando de 65 a 90°C.

5

Temperatura de peletização	Atividade de Beta-Glucanase (FBU/kg de ração)	
	(EG28)	(EG28+CtCBD)
Farinha grossa de misturador horizontal	239 000 ± 9 000 (100%)	1 148 000 ± 48 000 (100%)
Pélete (65°C)	227 000 ± 16 000 (95%)	1 007 000 ± 67 000 (88%)
Pélete (70°C)	217 000 ± 5 000 (91%)	1 012 000 ± 54 000 (88%)
Pélete (75°C)	227 000 ± 14 000 (95%)	993 000 ± 49 000 (86%)
Pélete (80°C)	215 000 ± 6 000 (90%)	1 030 000 ± 87 000 (90%)
Pélete (85°C)	188 000 ± 7 000 (79%)	904 000 ± 56 000 (79%)
Pélete (90°C)	149 000 ± 8 200 (62%)	861 000 ± 32 000 (75%)

Lista de organismos depositados

Cepa	Plasmídeo contido	Autoridade de depósito	Data de depósito	Número de depósito
ALK04245 de <i>Acremonium thermophilum</i>		CBS(1)	20 de setembro de 2004	CBS 116240
ALK04242 de <i>Thermoascus aurantiacus</i>		CBS(1)	20 de setembro de 2004	CBS 116239
ALK04265 de <i>Chaetomium thermophilum</i>		CBS(2)	8 de novembro de 1995	CBS 730.95
<i>Escherichia coli</i>	pALK1946	DS MZ(3)	7 de abril de 2006	DSM 18159
<i>Escherichia coli</i>	pALK1926	DSMZ	13 de maio de 2005	DSM 17326

⁽¹⁾o Centraalbureau Voor Schimmelcultures em Uppsalalaan 8, 3584 CT, Utrecht, Países Baixos

⁽²⁾o Centraalbureau Voor Schimmelcultures em Oosterstraat 1, 3742 SK BARNA, Países Baixos

⁽³⁾Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemanha

Referências

- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers and DJ Lipman. 1990.
5 Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Bailey MJ and KMH Nevalainen 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of solubilizing cellulase. Enz Microbiol Technol. 3: 153-157.
- Bendtsen J.D., Nielsen H., von Heijne G. and Brunak S. (2004)
10 Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol. 340: 783-795.
- Gasteiger, E, A Gattiker, C Hoogland, I Ivanyi, RD Appel and A Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31:3784-3788.
- 15 Haakana H, A Miettinen-Oinonen, V Joutsjoki, A Mantyla, P Suominen, and J Vehmaanpera. 2004. Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. Enz Microbiol Technol. 34: 159-167.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based
20 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.
- Henrissat B. and Bairoch A. (1996).Updating the sequence-
25 based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. 316: 695-696.
- Hong J., H. Tamaki, K. Yamamoto, and H. Kumagai. 2003. Cloning of a gene encoding a thermo-stabile endo- α -1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. Biotech. Letters 25:657-661.
- 30 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.* 59:257-268.

- Joutsjoki, VV, TK Torkkeli and KMH Nevalainen. 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.
- 5 Karhunen T, A Mantylä, 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.
- 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* 15:147-156.
- 10 Needleman S. and Wunsch C. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48, 443-453.
- 15 Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. and von Heijne G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-6.
- Paloheimo M, A Mantyla, J Kallio, and P Suominen. 2003. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Appl. Env. Microbiol.* 69:7073-7082.
- 20 Penttilä M, H Nevalainen, M Rättö, E Salminen and J Knowles. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61:155-164.
- 25 Raeder U and P Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.
- Rice P, Longden I and Bleasby A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16:276-277.
- 30 Sambrook J, EF Fritsch and T Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.
- Sambrook J and DW Russell. 2001. Molecular cloning, a labora-

tory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.

Srisodsuk M, Reinikainen T, Penttilä M and Teeri T. (1993) Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. J. Biol. Chem. Oct 5;268(28): 20756-5 61.

Stålbrand H, Siika-aho M, Tenkanen M and L Viikari. 1993. J. Biotechnol. 29:229-242.

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 pl 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.

Seqüência de Listagem

<110> AB Enzymes Oy

<120> Proteínas de Fusão Enzimática e seu Uso

<130> 2060570

<160> 15

<170> Patente em versão 3,2

<210> 1

<211> 1317

<212> DNA

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1317)

<220>

<221> Intron

<222> (107)..(161)

<220>

<221> Intron

<222> (221)..(280)

<220>

<221> Intron

<222> (434)..(492)

<220>

<221> Intron

<222> (558)..(631)

<220>

<221> Intron

<222> (730)..(790)

<400> 1

atgaagctcg gctctctcgt gctcgtctctc agcgcagcta ggcttacact gtcggccccc	60
ctcgcagaca ggaagcagga gaccaagcgt gcgaaagtat tccaatgttc gtaacatcca	120
cgtctggcctt gctggcttac tggcaactga caatggcgaa gggttcgggtt caaacgagtc	180
cggtgctgaa ttcggaagcc agaacccttc aggagtcgag gtcagcatgc ctgtactctc	240
tgcattatat taatatctca agaggcttac tctttcgcag ggaaaggatt atatatggcc	300
tgatcccaac accattgaca cattgatcag caaggggatg aacatctttc gtgtccccc	360
tatgatggag agattgggtc ccaactcaat gaccggctct ccggatccga actacctggc	420
agatctcata gcggtacatt tcaattccac catgtttgga gctgtcttcg ttgtgctgac	480
atttaatggt agactgtaaa tgcaatcacc cagaaagggtg cctacgccgt cgtcgaatcct	540
cataactacg gcagatagtg aggtccccgg ttctgggtatt gctgctgtat atctaagtag	600
atatgtgttt ctaacatttc cagattttca gctacaattc tataatctcg agcccttccg	660
atttccagac cttctggaaa acggtcgcct cacagtttgc ttcgaatcca ctggtcatct	720
tcgacactag taagctgaac acccgaaatt aactgagtct gagcatgtct gacaagacga	780

tccatgaaag ataacgaata ccacgatatg gaccagacct tagtcctcaa tctcaaccag 840
 gccgctatcg acggcatccg ttccgccgga gccacttccc agtacatctt tgtcgagggc 900
 aattcgtgga cgggggcatg gacctggacg aacgtgaacg ataacatgaa aagcctgacc 960
 gacccatctg acaagatcat atacgagatg caccagtacc tggactctga cggatccggg 1020
 acatcagcga cctgcgtatc ttcgaccatc ggtcaagagc gaatcaccag cgcaacgcaa 1080
 tggctcaggg ccaacgggaa gaagggcatc atcggcgagt ttgcggggcg agccaacgac 1140
 gtctgcgaga cggccatcac gggcatgctg gactacatgg cccagaacac ggacgtctgg 1200
 actggcgcca tctggtgggc ggccggggcg tgggtggggag actacatatt ctccatggag 1260
 ccggacaatg gcatcgcgta tcagcagata cttcctatct tgactccgta tctttga 1317

<210> 2
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 2

Met Lys Leu Gly Ser Leu Val Leu Ala Leu Ser Ala Ala Arg Leu Thr
1 5 10 15

Leu Ser Ala Pro Leu Ala Asp Arg Lys Gln Glu Thr Lys Arg Ala Lys
20 25 30

Val Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser
35 40 45

Gln Asn Leu Pro Gly Val Glu Gly Lys Asp Tyr Ile Trp Pro Asp Pro
50 55 60

Asn Thr Ile Asp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Met Asn Ile Phe Arg Val
65 70 75 80

Pro Phe Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Ser Met Thr Gly Ser Pro
85 90 95

Asp Pro Asn Tyr Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Val Asn Ala Ile Thr
100 105 110

Gln Lys Gly Ala Tyr Ala Val Val Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr
115 120 125

Tyr Asn Ser Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys
130 135 140

Thr Val Ala Ser Gln Phe Ala Ser Asn Pro Leu Val Ile Phe Asp Thr
145 150 155 160

Asn Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn
165 170 175

Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr
 180 185 190
 Ile Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Asn
 195 200 205
 Val Asn Asp Asn Met Lys Ser Leu Thr Asp Pro Ser Asp Lys Ile Ile
 210 215 220
 Tyr Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala
 225 230 235 240
 Thr Cys Val Ser Ser Thr Ile Gly Gln Glu Arg Ile Thr Ser Ala Thr
 245 250 255
 Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Lys Gly Ile Ile Gly Glu Phe Ala
 260 265 270
 Gly Gly Ala Asn Asp Val Cys Glu Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Asp
 275 280 285
 Tyr Met Ala Gln Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala
 290 295 300
 Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Asp Asn
 305 310 315 320
 Gly Ile Ala Tyr Gln Gln Ile Leu Pro Ile Leu Thr Pro Tyr Leu
 325 330 335

<210> 3
 <211> 1621
 <212> DNA
 <213> *Thermoascus aurantiacus*

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(1621)

<220>
 <221> Intron
 <222> (107)..(161)

<220>
 <221> Intron
 <222> (221)..(280)

<220>
 <221> Intron
 <222> (434)..(492)

<220>
 <221> Intron
 <222> (558)..(631)

<220>
 <221> Intron

<222> (730)..(790)

<220>

<221> Intron

<222> (1549)..(1612)

<400> 3

```

atgaagctcg gctctctcgt gctcgtctc agcgcagcta ggcttacact gtcggccct 60
ctgcagaca ggaagcagga gaccaagcgt gcgaaagtat tccaatgttc gtaacatcca 120
cgtctggctt gctggcttac tggcaactga caatggcgaa gggttcgggtt caaacgagtc 180
cggtgctgaa ttcggaagcc agaaccttcc aggagtcgag gtcagcatgc ctgtactctc 240
tgcattatat taatatctca agaggcttac tctttcgcag ggaaaggatt atatatggcc 300
tgatcccaac accattgaca cattgatcag caaggggatg aacatctttc gtgtccctt 360
tatgatggag agattgggtc ccaactcaat gaccggctct ccggatccga actacctggc 420
agatctcata gcggtacatt tcaattccac catgtttgga gctgtcttcg ttgtgctgac 480
atttaatggt agactgtaaa tgcaatcacc cagaaagggtg cctacgccgt cgtcgatcct 540
cataactacg gcagatagtg aggtccccgg ttctggtatt gctgctgtat atctaagtag 600
atatgtgttt ctaacatttc cacgatttca gctacaattc tataatctcg agcccttccg 660
atttccagac cttctggaaa acggtcgcct cacagttagc ttcgaatcca ctggtcatct 720
tcgacactag taagctgaac acccgaaatt aactgagtct gagcatgtct gacaagacga 780
tccatgaaag ataacgaata ccacgatatg gaccagacct tagtcctcaa tctcaaccag 840
gccgctatcg acggcatccg ttccgccgga gccacttccc agtacatctt tgtcgagggc 900
aattcgtgga ccggggcatg gacctggacg aacgtgaacg ataacatgaa aagcctgacc 960
gacctatctg acaagatcat atacgagatg caccagtacc tggactctga cggatccggg 1020
acatcagcga cctgcgtatc ttcgaccatc ggtcaagagc gaatcaccag cgcaacgcaa 1080
tggtcagggg ccaacgggaa gaagggcatc atcggcgagt ttgcggggcg agccaacgac 1140
gtctgcgaga cggccatcac gggcatgctg gactacatgg ccgagaacac ggacgtctgg 1200
actggcgcca tctggtgggc ggccggggcg tgggtggggag actacatatt ctccatggag 1260
ccggacaatg gcatcgcgta tcagcagata cttcctatct tgactccgta cgtacctggc 1320
cttgacggca gcaaccccg gcaacccgacc accaccgtcg ttcctcccg tctacctcc 1380
acctcccgtc cgaccagcag cactagctct cccgtttcga ccccgactgg ccagcccggc 1440
ggctgcacca ccgagaagtg gggccagtgc ggcggtatcg gctacaccgg ctgcactaac 1500
tgcgttgctg gcaccacctg cactcagctc aaccctggt acagccaggt atgtttctct 1560
tcccccttct agactcgctt ggatttgaca gttgctaaca tctgctcaac agtgccctgta 1620
a 1621

```

<210> 4

<211> 415

<212> PRT

<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 4

Met Lys Leu Gly Ser Leu Val Leu Ala Leu Ser Ala Ala Arg Leu Thr
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Pro Leu Ala Asp Arg Lys Gln Glu Thr Lys Arg Ala Lys
 20 25 30
 Val Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser
 35 40 45
 Gln Asn Leu Pro Gly Val Glu Gly Lys Asp Tyr Ile Trp Pro Asp Pro
 50 55 60
 Asn Thr Ile Asp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Met Asn Ile Phe Arg Val
 65 70 75 80
 Pro Phe Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Ser Met Thr Gly Ser Pro
 85 90 95
 Asp Pro Asn Tyr Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Val Asn Ala Ile Thr
 100 105 110
 Gln Lys Gly Ala Tyr Ala Val Val Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr
 115 120 125
 Tyr Asn Ser Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys
 130 135 140
 Thr Val Ala Ser Gln Phe Ala Ser Asn Pro Leu Val Ile Phe Asp Thr
 145 150 155 160
 Asn Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn
 165 170 175
 Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr
 180 185 190
 Ile Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Asn
 195 200 205
 Val Asn Asp Asn Met Lys Ser Leu Thr Asp Pro Ser Asp Lys Ile Ile
 210 215 220
 Tyr Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala
 225 230 235 240
 Thr Cys Val Ser Ser Thr Ile Gly Gln Glu Arg Ile Thr Ser Ala Thr
 245 250 255
 Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Lys Gly Ile Ile Gly Glu Phe Ala
 260 265 270

Gly Gly Ala Asn Asp Val Cys Glu Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Asp
 275 280 285

Tyr Met Ala Gln Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala
 290 295 300

Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Asp Asn
 305 310 315 320

Gly Ile Ala Tyr Gln Gln Ile Leu Pro Ile Leu Thr Pro Tyr Val Pro
 325 330 335

Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val Val Pro
 340 345 350

Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro
 355 360 365

Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp
 370 375 380

Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala
 385 390 395 400

Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 405 410 415

<210> 5
 <211> 1211
 <212> DNA
 <213> Acremonium thermophilum

<220>
 <221> gene
 <222> (13)..(1206)

<220>
 <221> Intron
 <222> (96)..(154)

<220>
 <221> Intron
 <222> (404)..(526)

<220>
 <221> Intron
 <222> (1134)..(1197)

<400> 5
 ggactgcgca tcatgcgctc ctcacccttt ctccgcgcag ctctggctgc cgctctgcct 60
 ctgagcgcgc atgccctcga cggaaagtcg acgaggtatg ccaatcctcg tacctctgcc 120
 ctctgtagaa acaagtgacc gactgcaaag acagatactg ggactgctgc aagccgtcct 180
 gcggctgggc cggaaaggcc tcggtgaacc agcccgtctt ctcgtgctcg gccgactggc 240
 agcgcacacg cgacttcaac gcgaagtcgg gctgcgacgg aggctccgcc tactcgtgcg 300

```

ccgaccagac gccctgggcg gtcaacgaca acttctcgta cggcttcgca gccacggcca 360
tcgccggcgg ctccgagtc agctggtgct ggcctgcta tgcgtgagtt ctctgcaagc 420
cgcttccac ccccgcttcc tgtgcaggcc gttcccccc taccaccca cttccccccc 480
cccgcctctg tgatcgggca tccgagctaa gttgctgtc gtccagactc accttcaact 540
cgggccccgt cgcgggcaag accatgggtg tgcatcgac cagcaccggc ggcgacctgg 600
gcagcaacca gtccgacctc gccatccccg gcggcgccgt gggcatcttc aacggctgcg 660
cctccagtt cggcgccctc cccggcgccc agtacggcg catcagcgac cgcagccagt 720
gctcgtcctt ccccgcgccg ctccagccgg gctgccagtg gcgcttcgac tggttccaga 780
acgccgacaa cccaccttc accttccagc gcgtgcagtg cccgtccgag ctcacgtccc 840
gcacgggctg taagcgcgac gacgacgcca gctatcccg cttcaaccg cctagcgtcc 900
ctggccttga cggcagcaac cccggcaacc cgaccaccac cgtcgttctt cccgcttcta 960
cctccacctc ccgtccgacc agcagacta gctctcccg ttcgaccccg actggccagc 1020
ccggcggtg caccaccag aagtggggcc agtgcggcg tatcggtac accggctgca 1080
ctaactgctg tgctggcacc acctgcactc agctcaacc ctggtacagc caggtatgtt 1140
tctcttcccc cttctagact cgcttggtt tgacagttgc taacatctgc tcaacagtgc 1200
ctgtaactgc a 1211

```

```

<210> 6
<211> 315
<212> PRT
<213> Acremonium thermophilum
<400> 6

```

```

Met Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Ala Leu Pro
1           5           10           15

```

```

Leu Ser Ala His Ala Leu Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys
20           25           30

```

```

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro
35           40           45

```

```

Val Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala
50           55           60

```

```

Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr
65           70           75           80

```

```

Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala
85           90           95

```

```

Ile Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu
100          105          110

```

Thr Phe Asn Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser
 115 120 125
 Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Leu Ala Ile
 130 135 140
 Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ser Gln Phe Gly
 145 150 155 160
 Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Asp Arg Ser Gln Cys
 165 170 175
 Ser Ser Phe Pro Ala Pro Leu Gln Pro Gly Cys Gln Trp Arg Phe Asp
 180 185 190
 Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Gln Arg Val Gln
 195 200 205
 Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asp Asp Asp
 210 215 220
 Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro Pro Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
 225 230 235 240
 Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val Val Pro Pro Ala Ser Thr
 245 250 255
 Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Ser Thr Pro
 260 265 270
 Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly
 275 280 285
 Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala Gly Thr Thr Cys
 290 295 300
 Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 305 310 315

<210> 7
 <211> 1663
 <212> DNA
 <213> Chaetomium thermophilum

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(1663)

<220>
 <221> Intron
 <222> (1591)..(1654)

<400> 7
 atgatgtata agaagttcgc cgctctcgcc gccctcgtgg ctggcgcttc cgcccagcag

```

gcttgctccc tcaccgctga gaaccaccct agcctcacct ggaagcgctg cacctctggc 120
ggcagctgct cgaccgtgaa cggcgccgct accatcgatg ccaactggcg ctggactcac 180
accgtctccg gctcgaccaa ctgctacacc ggcaaccagt gggatacctc cctctgcact 240
gatggcaaga gctgcgcca gacctgctgc gtcgatggcg ctgactactc ttcgacctat 300
ggtatcacca ccagcgggta ctccctgaac ctcaagttcg tcaccaagca ccagtacggc 360
accaacgtcg gctcccgtgt ctatctgatg gagaacgaca ccaagtacca gatgttcgag 420
ctcctcggca acgagttcac cttcgatgtc gatgtctcca acctgggctg cgggtctcaac 480
ggcgccctct acttcgtttc catggatgct gatgggtggc tgagcaaata ctctggcaac 540
aaggctggcg ccaagtacgg taccggctac tgcgatgtc agtgcccgcg cgacctcaag 600
ttcatcaacg gcgaggccaa cgttgggaac tggacccct cgaccaacga tgccaacgcc 660
ggcttcggcc gctatggcag ctgctgctct gagatggatg tctgggaggc caacaacatg 720
gctactgcct tcactctca cccttgacc accgttggcc agagccgctg cgaggccgac 780
acctgcggtg gcacctacag ctctgaccgc tatgtggtg tttgcgacct tgatggctgc 840
gacttcaacg cctaccgcca aggcgacaag acctctacg gcaagggcat gactgtcgac 900
accaacaaga agatgacctg cgtcacccag ttccacaaga actcggctgg cgtcctcagc 960
gagatcaagc gcttctacgt ccaggacggc aagatcattg ccaacgctga gtccaagatc 1020
cccggcaacc ccggaactc cattaccag gagtattgag atgccagaa ggtcgcttc 1080
agtaacaccg atgacttcaa ccgcaagggc ggtatggctc agatgagcaa ggcctcgca 1140
ggccccatgg tcctgggtcat gtccgtctgg gatgacct acgccaacat gctctggctc 1200
gactcgacct acccatcga ccaggccggc gccccggcg ccgagcgcg tgcttgcccc 1260
accacctccg gtgtccctgc cgagatcgag gccagggtcc ccaacagcaa cgtcatcttc 1320
tccaacatcc gtttcggccc catcggtcg accgtccctg gccttgacgg cagcaacccc 1380
ggcaaccgca ccaccaccgt cgttctctcc gtttctacct ccacctccg tccgaccagc 1440
agcactagct ctcccgtttc gaccccgact ggccagcccc gcggctgcac caccagaag 1500
tgggggccagt gcggcggtat cggctacacc ggctgcacta actgcgttgc tggcaccacc 1560
tgcactcagc tcaacccctg gtacagccag gtatgtttct cttccccctt ctagactcgc 1620
ttggatttga cagttgctaa catctgctca acagtgcctg taa 1663

```

```

<210> 8
<211> 1076
<212> DNA
<213> Acremonium thermophilum

```

```

<220>
<221> gene
<222> (1)..(1076)

```

```

<220>
<221> Intron
<222> (84)..(142)

```

<220>
 <221> Intron
 <222> (392)..(514)

<400> 8
 atgcgctcct caccctttct ccgcgcagct ctggctgccg ctctgcctct gagcgcccat 60
 gccctcgacg gaaagtcgac gaggtatgcc aatcctcgta cctctgccct ctgtagaaac 120
 aagtgaccga ctgcaaagac agatactggg actgctgcaa gccgtcctgc ggctggccgg 180
 gaaaggcctc ggtgaaccag cccgtcttct cgtgctcggc cgactggcag cgcatacagc 240
 acttcaacgc gaagtcgggc tgcgacggag gctccgccta ctctgctgcc gaccagacgc 300
 cctgggcggg caacgacaac ttctcgtagc gcttcgcagc cacggccatc gccggcgggt 360
 ccgagtccag ctggtgctgc gcctgctatg cgtgagttct ctgcaagccg cttcccaccc 420
 ccgctttctg tgcaggccgc tttccccta cccaccact tcccccccc cgctctgtg 480
 atcgggcacg cgagctaagt tgcgtgctgt ccagactcac cttcaactcg ggccccgtcg 540
 cgggcaagac catggtggtg cagtcgacca gcaccggcgg cgacctgggc agcaaccagt 600
 tcgacctcgc catccccggc ggccggcgtg gcatcttcaa cggctgcgcc tcccagttcg 660
 gcggcctccc cggcgcccag tacggcggca tcagcgaccg cagccagtgc tcgtccttcc 720
 ccgcgccgct ccagccgggc tgccagtggc gcttcgactg gttccagaac gccgacaacc 780
 ccaccttcac cttccagcgc gtgcagtgcc cgtccgagct cacgtcccg cagggtgta 840
 agcgcgacga cgacgccagc tateccgtct tcaaccgcgc tagcgggtggc tccccagca 900
 ccaccagcac caccaccagc tccccgtccg gtccacggg caaccctcct ggaggcgggtg 960
 gctgcactgc ccagaagtgg gccagtgcg gcggcactgg cttcacgggc tgcaccacct 1020
 gcgtctcggg caccacctgc caggtgcaga accagtggta ttcccagtgt ctgtga 1076

<210> 9
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 9
 attaaccgcg gactgcgcat catgaagctc ggctctctcg tgctc 45

<210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 10
 aactgaggca tagaaactga cgatcatatt 29

<210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> *Chaetomium thermophilum*

<400> 11
 taatttacgt acctggcctt gacggcag 28

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> *Chaetomium thermophilum*

<400> 12
 attactgca gttacaggca ctgttgagca

30

<210> 13
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> *Acremonium thermophilum*

<400> 13
 attaacgcg gactgcgcat catgcgtcc tcacccttc tc

42

<210> 14
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> *Acremonium thermophilum*

<400> 14
 ttaatctgca gtcacagaca ctgggaatac cac

33

<210> 15
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> *Chaetomium thermophilum*

<400> 15

Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val
 1 5 10 15

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

Ser Pro Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln
 35 40 45

Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys
 50 55 60

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

Leu

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão de celulase compreendendo uma primeira seqüência de aminoácidos de um núcleo de endoglucanase, e uma segunda seqüência de aminoácidos compreendendo um encadeador e domínio de
5 ligação de celulose (CBD) tendo no mínimo 75% de identidade com a SEQ ID NO: 15, ou uma variante ou fragmento da mesma tendo afinidade de ligação de celulose.

2. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que a endoglucanase pertence à família de glicosil hidrolase 5.

10 3. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o núcleo da endoglucanase é derivado de *Thermoascus aurantiacus* ou *Acremonium thermophilum*, especialmente de *T. aurantiacus* CBS 116239 ou *A. thermophilum* CBS 116240.

15 4. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que o núcleo da endoglucanase tem no mínimo 75% de identidade com a SEQ ID NO: 2, ou uma variante ou fragmento da mesma tendo afinidade de celulase.

5. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 4, em que o núcleo da endoglucanase compreende os aminoácidos 19 a 334 da SEQ ID NO: 2.

20 6. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que o núcleo da endoglucanase tem no mínimo 75% de identidade com o núcleo da endoglucanase codificado pela seqüência compreendida na SEQ ID NO: 8, ou uma variante ou fragmento da mesma tendo afinidade de celulase.

25 7. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que o encadeador e CDB são derivados de celobiohidrolase de *Chaetomium thermophilum*, especialmente de *C. thermophilum* CBS 730.95.

8. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que o núcleo da endoglucanase compreende a seqüência de SEQ ID NO: 2 e o encadeador e CDB compreendem a seqüência de SEQ ID NO: 15.

30 9. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1 compreendendo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou 6, ou uma variante ou fragmento da mesma tendo afinidade de celulase e de ligação de celu-

lose.

10. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, em que o núcleo da endoglucanase é codificado por um gene equivalente ao incluído em *E. coli* DSM 17326.

5 11. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, a qual é codificada por um gene de fusão equivalente ao incluído em *E. coli* DSM 18159.

12. Polinucleotídeo isolado selecionado entre o grupo consistindo em:

10 a) uma sequência de nucleotídeos de SEW ID NO: 3 ou 5, ou uma sequência codificando uma proteína de fusão da reivindicação 1,
b) um filamento complementar de a), e
c) uma sequência que é degenerada em consequência do código genético para qualquer uma das sequências de a) ou b).

15 13. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 12, o qual compreende um gene de fusão equivalente ao incluído na cepa de *E. coli* DSM 18159.

14. Vetor de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeos como definido na reivindicação 12.

20 15. Célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão como definido na reivindicação 14.

16. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 15, a qual é um fungo, preferencialmente do gênero *Trichoderma*.

25 17. Método para produzir uma proteína de fusão como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, compreendendo as etapas de transformar uma célula hospedeira com um vetor de expressão codificando a referida proteína de fusão e cultivar a referida célula hospedeira sob condições que possibilitem a expressão da referida proteína de fusão, e opcionalmente recuperar e purificar a proteína de fusão produzida.

30 18. Preparação enzimática compreendendo a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

19. Processo para tratar material celulósico, em que o referido

processo compreende contatar o material celulósico com a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou a preparação enzimática como definida na reivindicação 18.

5 20. Processo de acordo com a reivindicação 19, em que o material celulósico é material têxtil, plantas usadas em ração animal, ou polpa derivada de madeira ou fibra secundária.

21. Processo de acordo com a reivindicação 19, em que se extrai óleo de material vegetal.

10 22. Processo para bioesmerilhamento, cujo processo compreende a etapa de contatar uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou uma preparação enzimática como definida reivindicação 18, com tecido ou vestuário de denim.

15 23. Processo para bioacabamento, o qual compreende a etapa de contatar uma proteína de fusão de celulase como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou a preparação enzimática como definida em reivindicação 18, com materiais têxteis como tecidos ou vestuário ou fio.

24. Composição de detergente compreendendo a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e auxiliares de detergente.

20 25. Ração animal compreendendo a proteína de fusão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

26. Cepa de *Escherichia coli* tendo número de acesso DSM 18159.

FIG. 1

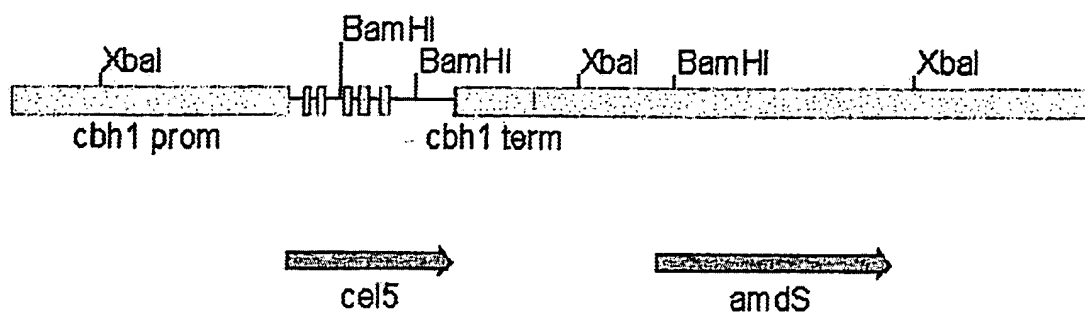


FIG. 2(A)

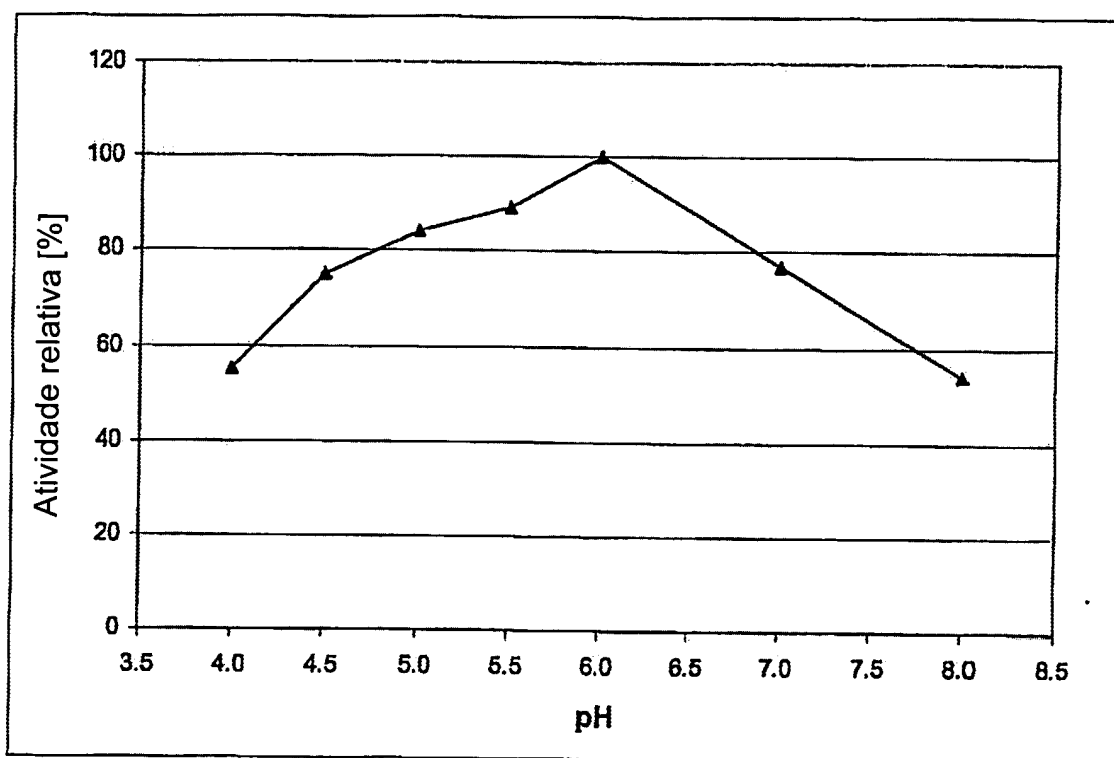


FIG. 2(B)

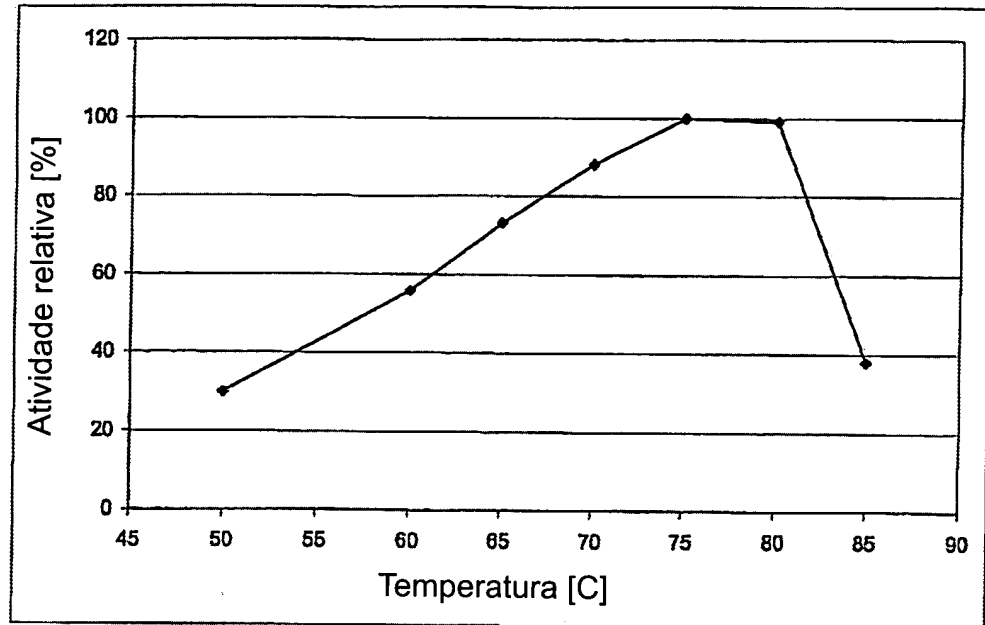


FIG. 3

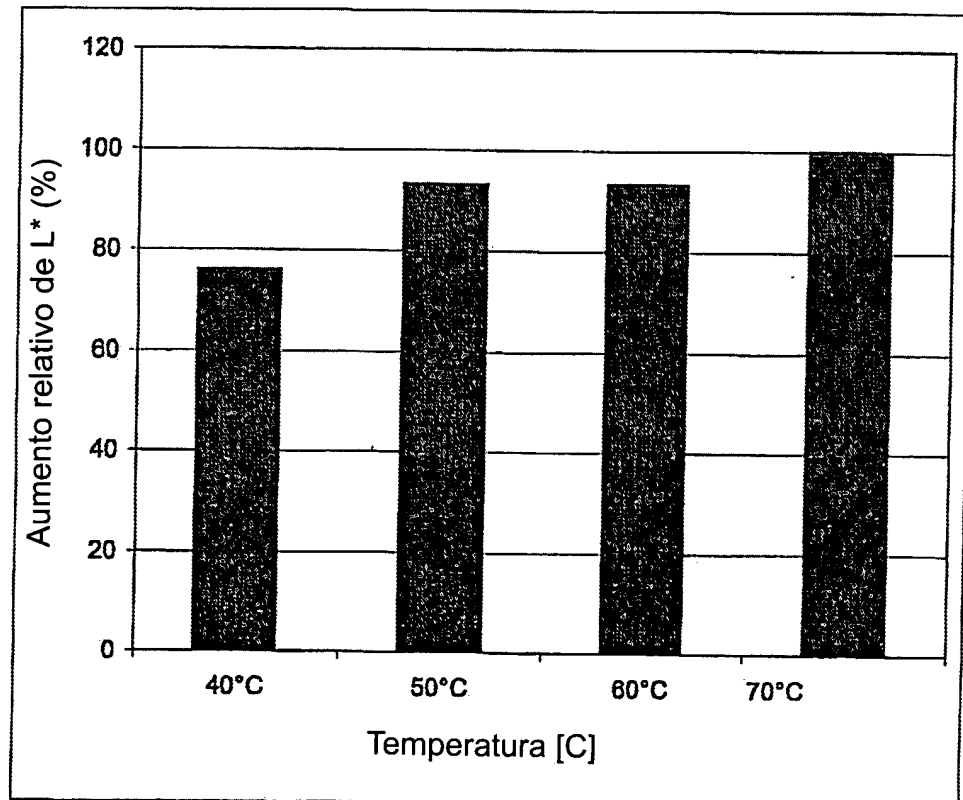


FIG. 4

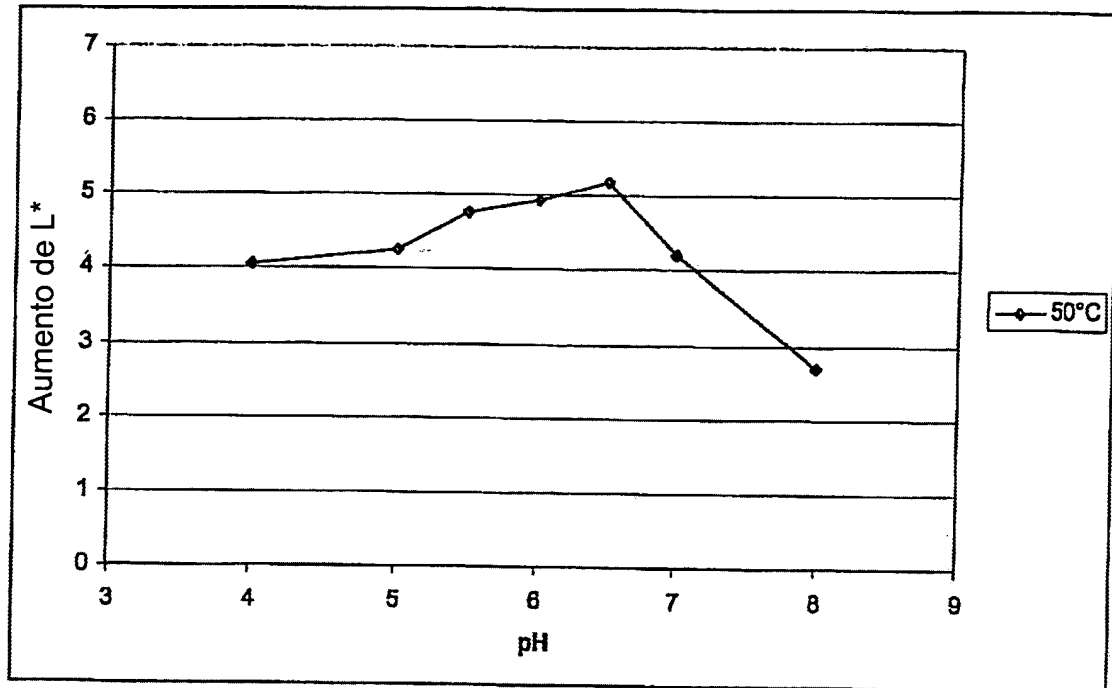


FIG. 5

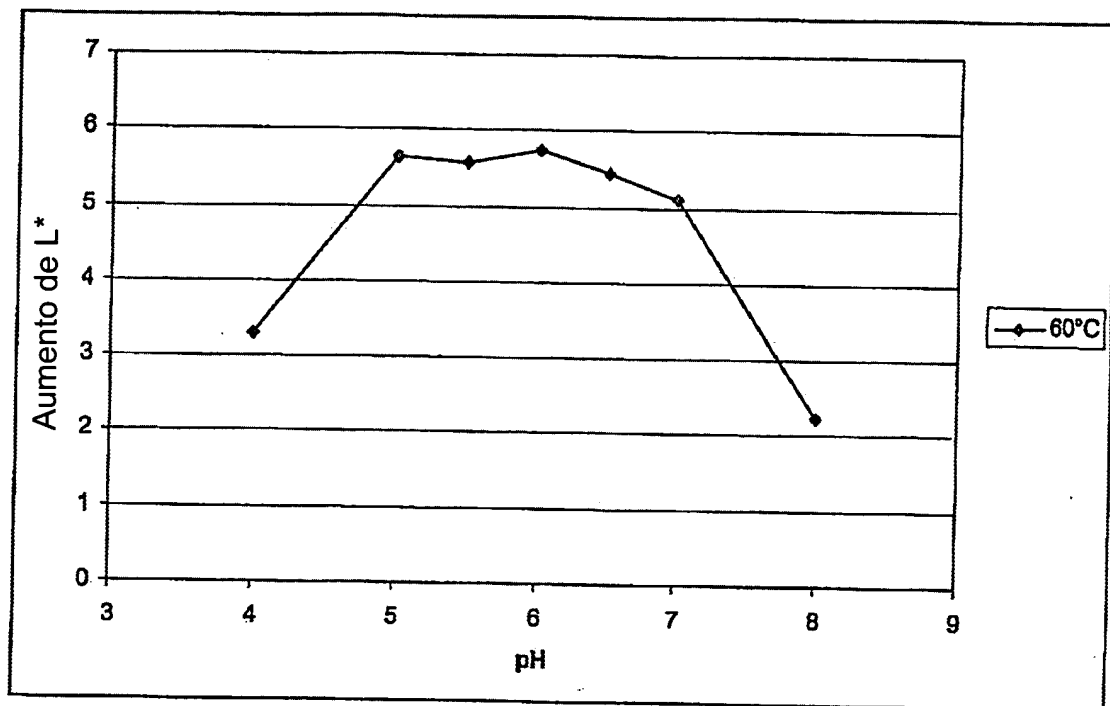


FIG. 6

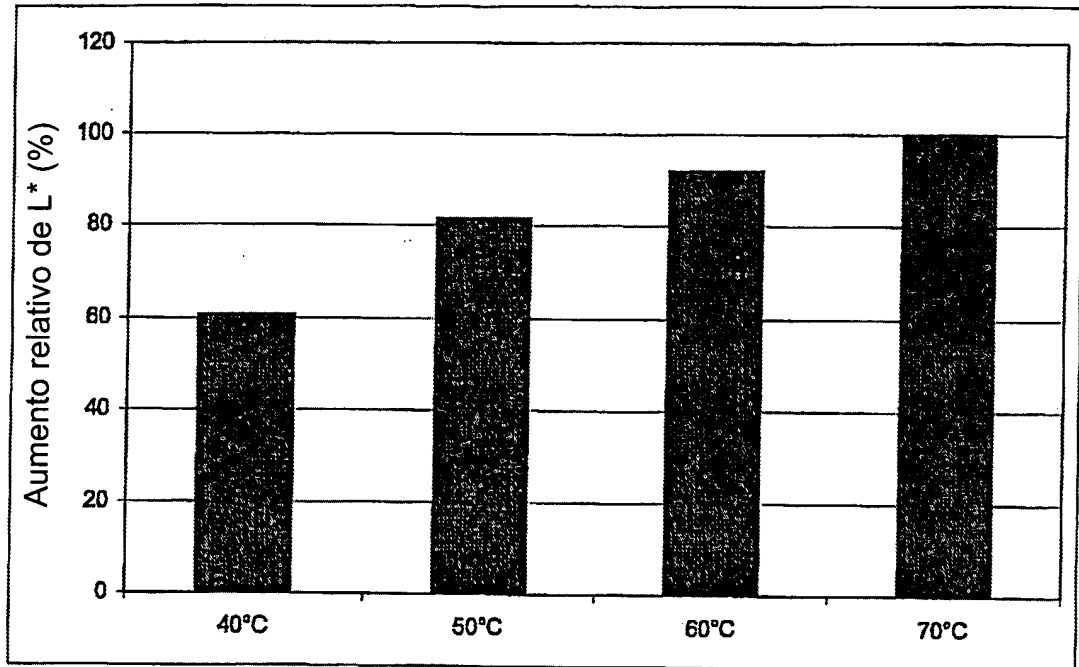


FIG. 7

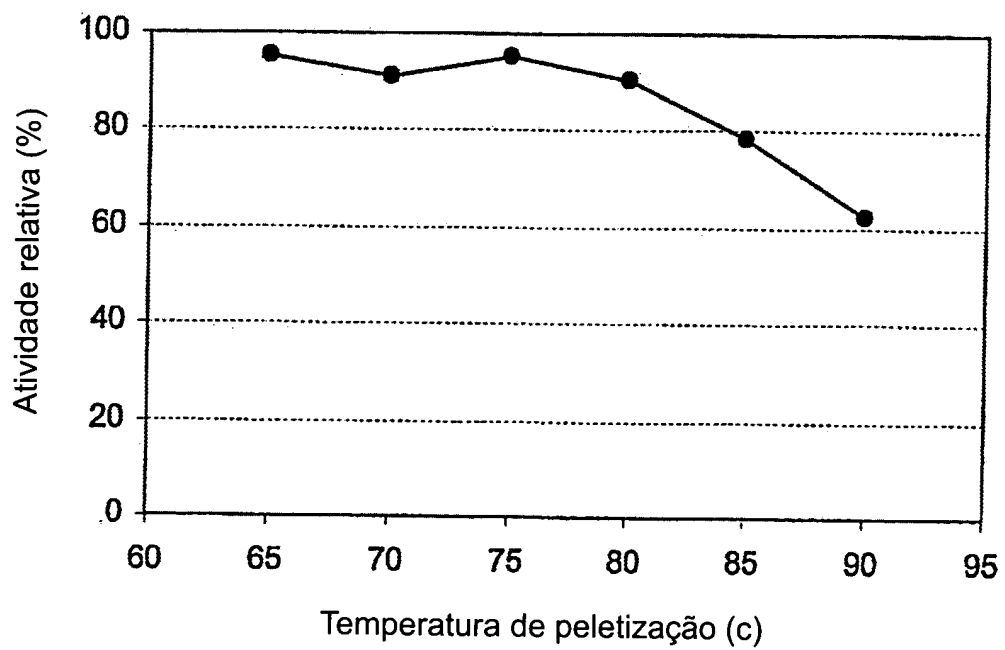
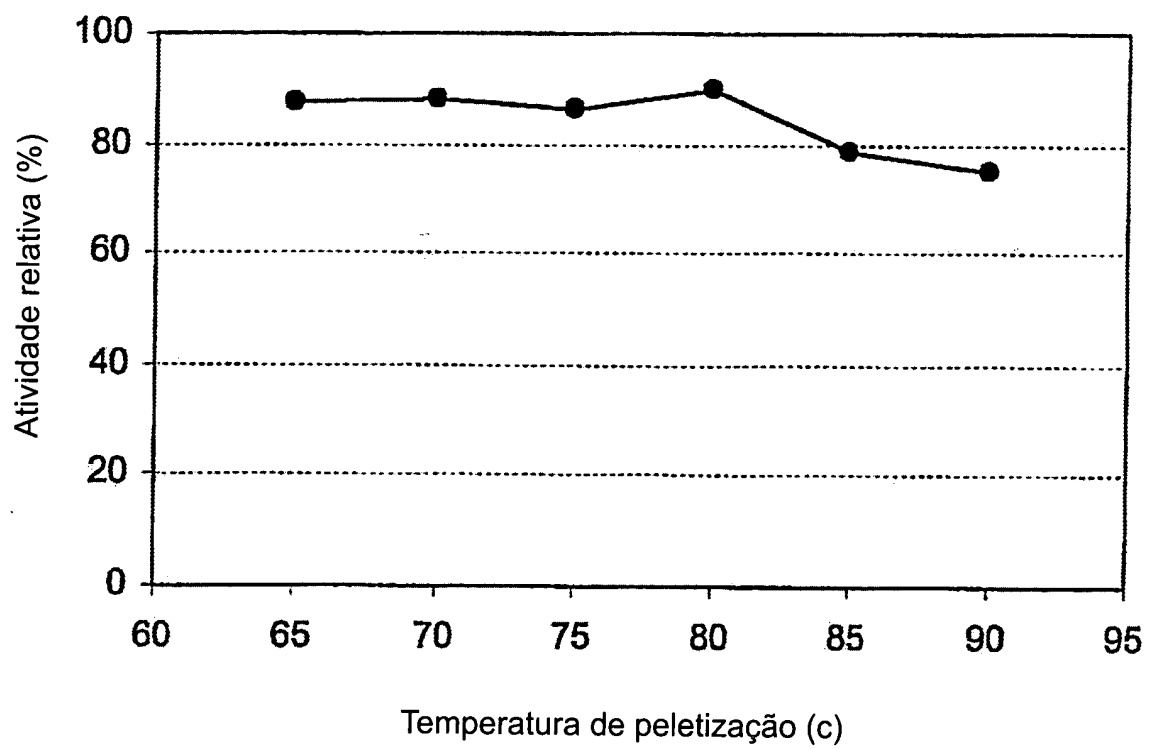


FIG. 8



RESUMO

Patente de Invenção: **"PROTEÍNAS DE FUSÃO ENZIMÁTICA E SEU USO"**.

São descritas proteínas de fusão de celulase compreendendo
5 uma região de núcleo de endoglucanase e um domínio de ligação de celulose heterólogo. As proteínas de fusão podem ser produzidas por técnicas re-combinantes usando polinucleotídeos apropriados, expressando vetores de células hospedeiras. As proteínas de fusão e preparações enzimáticas das
10 mesmas são úteis para tratar material celulósico, tal como material têxtil, e são particularmente úteis em bioesmerilhamento de denim ou em bioacabamento de tecidos e vestuário. Além disso, as proteínas de fusão podem ser usadas na indústria de papel e polpa, em extração de óleo de plantas, composições de detergente, ou para melhorar a qualidade de ração animal.