



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

(11) PI 0820615-5 B1



(22) Data do Depósito: 03/12/2008

(45) Data de Concessão: 12/05/2020

(54) Título: CÉLULA MICROBIANA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE DE ACETIL-XILANO ESTERASE, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA E MÉTODO DE DEGRADAR UM MATERIAL CONTENDO XILANO

(51) Int.Cl.: A23K 10/30; C12N 9/18.

(30) Prioridade Unionista: 06/12/2007 US 60/992995.

(73) Titular(es): NOVOZYMES A/S.

(72) Inventor(es): MICHELLE MARANTA; KIMBERLY BROWN.

(86) Pedido PCT: PCT US2008085380 de 03/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/073709 de 11/06/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/06/2010

(57) Resumo: CÉLULA MICROBIANA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE DE ACETIL-XILANO ESTERASE, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA E MÉTODO DE DEGRADAR UM MATERIAL CONTENDO XILANO A presente invenção refere-se aos polipeptídeos isolados tendo atividade de acetil-xilano-esterase e aos polinucleotídeos isolados codificadores dos polipeptídeos. A invenção também se refere aos construtos de ácido nucleico, vetores, e células hospedeiras compreendendo os polinucleotídeos bem como aos métodos de produzir e de usar os polipeptídeos.

“CÉLULA MICROBIANA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE DE ACETIL-XILANO ESTERASE, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PROTEÍNA E MÉTODO DE DEGRADAR UM MATERIAL CONTENDO XILANO”

Referência à Listagem de Sequências

[001] Este pedido contém uma Listagem de Sequências na forma legível por computador. A forma legível por computador é aqui incorporada como referência.

Referência ao Depósito de Material Biológico

[002] Este pedido contém uma referência a um depósito de material biológico, cujo depósito é aqui incorporado como referência.

Fundamentos da Invenção

Campo da Invenção

[003] A presente invenção refere-se aos polipeptídeos isolados tendo atividade de acetil-xilano-esterase e aos polinucleotídeos isolados codificadores dos polipeptídeos. A invenção também se refere aos construtos de ácido nucleico, aos vetores, e às células hospedeiras compreendendo os polinucleotídeos bem como aos métodos de produzir e de usar os polipeptídeos.

Descrição da Arte Relacionada

[004] Polissacarídeos de parede celular de planta constituem geralmente 90% da parede celular de planta e podem ser divididos em três grupos: celulose, hemicelulose, e pectina. Celulose representa o constituinte principal dos polissacarídeos de parede celular. Hemiceluloses são o segundo constituinte mais abundante de paredes de célula de planta. O polímero de hemicelulose principal é xilano. A estrutura de xilanos encontrada nas paredes celulares de plantas pode diferir significativamente dependendo de sua origem, mas sempre contém uma estrutura principal de D-

xilose beta-1,4-ligada. A estrutura principal de D-xilose beta-1,4-ligada pode estar substituída com vários grupos laterais, tais como resíduos de L-arabinose, D-galactose, acetila, feruloíla, p-coumaroíla, e ácido glicurônico.

[005] A biodegradação da estrutura principal de xilano depende de duas classes de enzimas: endoxilanases e beta-xilosidases. Endoxilanases (EC 3.2.1.8) clivam a estrutura principal de xilano em oligossacarídeos menores, que podem ser adicionalmente degradados em xilose por beta-xilosidases (EC 3.2.1.37). Outras enzimas envolvidas na degradação de xilano incluem, por exemplo, acetil-xilano-esterase, arabinase, alfa-glicuronidase, feruloil-esterase, e ácido-p-coumárico-esterase.

[006] Acetil-xilano-esterase (EC 3.1.1.6) remove os grupos O-acetila das posições 2 e/ou 3 dos resíduos de beta-D-xilopiranosila de acetil-xilano. Acetil-xilano desempenha um papel importante na hidrólise de xilano porque os grupos laterais acetila podem interferir estericamente com a aproximação das enzimas que clivam a estrutura principal. Remoção dos grupos acetila laterais facilita a ação de endoxilanases. Um sistema de classificação para carboidrato-esterases, baseado em similaridade de sequência, tem levado à definição de 13 famílias, sete das quais contêm acetil-xilano-esterases (Henrissat B., 1991, *Biochem. J.* 280: 309-316, e Henrissat e Bairoch, 1996, *Biochem. J.* 316: 695-696).

[007] Margolles-Clark *et al.*, 1996, *Eur. J. Biochem.* 237: 553-560, revelam uma acetil-xilano-esterase de *Trichoderma reesei*. Sundberg e Poutanen, 1991, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13: 1-11, revelam a purificação e as propriedades de duas acetil-xilano-esterases de *Trichoderma reesei*. WO 2005/001036 revela um gene de acetil-xilano-esterase de *Trichoderma reesei*. Patente U.S. de Nº 5.681.732 revela um gene de acetil-xilano-esterase de *Aspergillus niger*. Patente U.S. de Nº 5.763.260 revela métodos para alterar as propriedades de xilano acetilado.

[008] A presente invenção refere-se aos polipeptídeos

tendo atividade de acetil-xilano-esterase e ao polinucleotídeos codificadores de polipeptídeos.

Sumário da Invenção

[009] A presente invenção refere-se aos polipeptídeos isolados tendo atividade de acetil-xilano-esterase selecionados do grupo consistindo de:

(a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 75% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2;

(b) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições de estringência pelo menos média-alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii);

(c) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1; e

(d) uma variante compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos (vários) do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[010] A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos isolados codificadores de polipeptídeos tendo atividade de acetil-xilano-esterase, selecionados do grupo consistindo de:

(a) um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 75% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2;

(b) um polinucleotídeo que hibridiza sob condições de

estringência de pelo menos média-alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii);

(c) um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1; e

(d) um polinucleotídeo codificador de uma variante compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos (vários) do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[011] A presente invenção também se refere aos construtos de ácido nucleico, aos vetores de expressão recombinantes, às células hospedeiras recombinantes compreendendo os polinucleotídeos, e aos métodos de produzir um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[012] A presente invenção também se refere aos métodos de inibir a expressão de um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase em uma célula, compreendendo administrar à célula ou expressar na célula uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), sendo que a molécula de dsRNA compreende uma subsequência de um polinucleotídeo da presente invenção. A presente invenção também se refere a uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) inibitório, sendo que opcionalmente o dsRNA é uma molécula de siRNA ou de miRNA.

[013] A presente invenção também se refere aos métodos para degradar um material de xilano com um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[014] A presente invenção também se refere às plantas compreendendo um p compreendendo um polinucleotídeo isolado codificador de um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[015] A presente invenção também se refere aos métodos de produzir um polipeptídeo tendo acetil-xilano-esterase, compreendendo: (a) cultivar uma célula de planta ou uma planta transgênica compreendendo um polinucleotídeo codificador do polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[016] A presente invenção adicionalmente se refere aos construtos de ácido nucleico compreendendo um gene codificador de uma proteína, sendo que o gene está operacionalmente ligado a uma sequência de nucleotídeos codificadora de um peptídeo de sinal compreendendo ou consistindo de aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 2, sendo que o gene é estranho à sequência de nucleotídeos.

Descrição Breve das Figuras

[017] Figuras 1A e 1B mostram a sequência de DNA genômico e a sequência de aminoácidos deduzida de uma acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* DSM 1800 CE1 (SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente). Sequências intrônicas preditas estão sublinhadas em negrito.

[018] Figura 2 mostra um mapa de restrição de pMMar6.

[019] Figura 3 mostra um mapa de restrição de pHinsAXE2.

Definições

[020] **Atividade de acetil-xilano-esterase:** O termo "atividade de acetil-xilano-esterase" é aqui definido como uma atividade de carboxil-esterase (EC 3.1.1.72) que catalisa a hidrólise de grupos acetila de xilano polimérico, xilose acetilada, glicose acetilada, acetato de alfa-naftila, e acetato de p-nitro-fenila. Para os propósitos da presente invenção, atividade de acetil-xilano-esterase é determinada de acordo com o procedimento aqui descrito nos Exemplos. Uma unidade de atividade de acetil-xilano-esterase é

definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ânion p-nitro-fenolato por minuto em pH 5, a 25°C.

[021] Os polipeptídeos da presente invenção têm pelo menos 20%, preferivelmente pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, muito mais preferivelmente mais preferivelmente pelo menos 100% da atividade de acetil-xilano-esterase do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[022] **Família CE1 ou CE1:** O termo "Família CE1" ou "CE1" é aqui definido como um polipeptídeo caindo dentro da Família de carboidrato-esterase de acordo com Coutinho e Henrissat, (1999) "Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach"; em "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat e B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12.

[023] **Material contendo xilano:** O termo "material contendo xilano" é aqui definido como qualquer material compreendendo xilano como um constituinte. Xilano é um polissacarídeo de parede celular de planta contendo uma estrutura principal de resíduos de xilose beta-1,4-ligados. Cadeias laterais de ácido 4-O-metil-glicurônico e arabinose estão geralmente presentes em quantidade variadas, juntamente com grupos acetila e feruloíla. Xilano é um constituinte principal de hemicelulose.

[024] **Polipeptídeo isolado:** O termo "polipeptídeo isolado" como aqui usado refere-se a um polipeptídeo que é isolado de uma fonte. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é pelo menos 1% puro, preferivelmente pelo menos 5% puro, mais preferivelmente pelo menos 10% puro, mais preferivelmente pelo menos 20% puro, mais preferivelmente pelo menos 40% puro, mais preferivelmente pelo menos 60% puro, ainda mais

preferivelmente pelo menos 80% puro, e muito mais preferivelmente pelo menos 90% puro, conforme determinado por SDS-PAGE.

[025] **Poli-peptídeo substancialmente puro:** O termo "poli-peptídeo substancialmente puro" denota aqui uma preparação de poli-peptídeo que contém no máximo 10%, preferivelmente no máximo 8%, mais preferivelmente no máximo 6%, mais preferivelmente no máximo 5%, mais preferivelmente no máximo 4%, mais preferivelmente no máximo 3%, ainda mais preferivelmente no máximo 2%, muito mais preferivelmente no máximo 1%, e ainda muito mais preferivelmente no máximo 0,5% em peso do outro material de poli-peptídeo com o qual ele está nativamente ou recombinantemente associado. portanto, é preferido que o poli-peptídeo substancialmente puro seja pelo menos 92% puro, preferivelmente pelo menos 94% puro, mais preferivelmente pelo menos 95% puro, mais preferivelmente pelo menos 96% puro, mais preferivelmente pelo menos 97% puro, mais preferivelmente pelo menos 98% puro, ainda mais preferivelmente pelo menos 99% puro, muito mais preferivelmente pelo menos 99.5% puro, e ainda muito mais preferivelmente 100% puro em peso do material de poli-peptídeo total presente na preparação. Os poli-peptídeos da presente invenção estão preferivelmente em uma forma substancialmente pura, *i.e.*, que a preparação de poli-peptídeo está essencialmente livre de outro material de poli-peptídeo com o qual ela está nativamente ou recombinantemente associada. Isto pode ser realizado, por exemplo, pela preparação do poli-peptídeo por métodos recombinantes bem conhecidos ou por métodos de purificação clássicos.

[026] **Poli-peptídeo maduro:** O termo "poli-peptídeo maduro" é aqui definido como um poli-peptídeo em sua forma final após tradução e quaisquer modificações depois de tradução, tais como processamento N-terminal, truncamento C-terminal, glicosilação, fosforilação, etc. Em um aspecto preferido, o poli-peptídeo maduro é

composto dos aminoácidos 20 a 377 de SEQ ID NO: 2 baseado no programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6) que prediz se os aminoácidos 1 a 9 de SEQ ID NO: 2 são um peptídeo de sinal.

[027] **Sequência codificadora de polipeptídeo maduro:**

O termo "sequência codificadora de polipeptídeo maduro" é aqui definido como uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo maduro tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto preferido, a sequência codificadora de polipeptídeo maduro é de nucleotídeos 58 a 1266 de SEQ ID NO: 1 baseado no programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que prediz se os nucleotídeos 1 a 57 de SEQ ID NO: 1 codificam um peptídeo de sinal.

[028] **Identidade:** A relação entre duas sequências de aminoácidos ou entre duas sequências de nucleotídeos é descrita pelo parâmetro "identidade".

[029] Para os propósitos da presente invenção, o grau de identidade entre duas sequências de aminoácidos é determinado usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) conforme implementado pelo programa Needle do pacote EMBOSS ("EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite", Rice *et al.*, 2000, *Trends in Genetics* 16: 276-277), preferivelmente versão 3.0.0 ou posterior. Os parâmetros ótimos usados são penalidade de lacuna de 10, penalidade de extensão lacuna de 0,5, e a matriz de substituição EBLOSUM62 (versão EMBOSS de BLOSUM62). O resultado de Needle chamado de "identidade mais longa" (obtido usando a opção *-nobrief*) é utilizado como a identidade percentual e é calculado como segue: (Resíduos Idênticos x 100)/(Comprimento de Alinhamento - Número Total de Lacunas em Alinhamento).

[030] Para os propósitos da presente invenção, o grau de identidade entre duas sequências de desoxirribonucleotídeo é determinado

usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *supra*) conforme implementado no programa Needle do pacote EMBOSS ("EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite", Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferivelmente versão 3.0.0 ou posterior. Os parâmetros opcionais usados são penalidade de lacuna de 10, penalidade de extensão lacuna de 0,5, e a matriz de substituição EDNAFULL (versão EMBOSS de NCBI NUC4.4). O resultado de Needle chamado de "identidade mais longa" (obtido usando a opção *-nobrief*) é utilizado como a identidade percentual e é calculado como segue: $(\text{Resíduos Idênticos} \times 100) / (\text{Comprimento de Alinhamento} - \text{Número Total de Lacunas em Alinhamento})$:

[031] $(\text{Desoxirribonucleotídeos Idênticos} \times 100) / (\text{Comprimento de Alinhamento} - \text{Número Total de Lacunas em Alinhamento})$

[032] **Sequência homóloga:** O termo "sequência homóloga" é aqui definido como uma proteína predita que tem um valor E (ou escore de expectativa) de menor do que 0,001 em uma pesquisa *tfasty* (Pearson, W.R., 1999, em *Bioinformatics Methods and Protocols*, S. Misener e S. A. Krawetz, ed., pp. 185-219) com a acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* de SEQ ID NO: 2 ou o seu polipeptídeo maduro.

[033] **Fragmento de polipeptídeo:** O termo "fragmento de polipeptídeo" é aqui definido como um polipeptídeo tendo um ou mais (vários) aminoácidos deletados da terminação amino e/ou carboxila do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2; ou uma sua sequência homóloga; sendo que o fragmento tem atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto preferido, um fragmento contém pelo menos 310 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 325 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 340 resíduos de aminoácido, do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2 ou uma sua sequência homóloga.

[034] **Subsequência:** O termo "subsequência" é aqui definido como uma sequência de nucleotídeos tendo um ou mais (vários)

nucleotídeos deletados da extremidade 5' e/ou 3' da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1; ou de uma sua sequência homóloga; sendo que a subsequência codifica um fragmento de polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto preferido, uma subsequência contém pelo menos 930 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 975 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 1020 nucleotídeos da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1 ou uma sua sequência homóloga.

[035] **Variante alélica:** O termo "variante alélica" denota aqui quaisquer duas ou mais formas alternativas de um gene ocupando o mesmo local cromossômico. Variação alélica decorre naturalmente através de mutação, e pode resultar em polimorfismo dentro de populações. Mutações de gene podem ser silenciosas (sem mudança no polipeptídeo codificado) ou podem codificar polipeptídeos tendo sequências de aminoácidos alteradas. Uma variante alélica de um polipeptídeo é um polipeptídeo codificado por uma variante alélica de um gene.

[036] **Polinucleotídeo isolado:** O termo "polinucleotídeo isolado" como aqui usado refere-se a um polinucleotídeo que é isolado de uma fonte. Em um aspecto preferido, o polinucleotídeo é pelo menos 1% puro, preferivelmente pelo menos 5% puro, mais preferivelmente pelo menos 10% puro, mais preferivelmente pelo menos 20% puro, mais preferivelmente pelo menos 40% puro, mais preferivelmente pelo menos 60% puro, ainda mais preferivelmente pelo menos 80% puro, e muito mais preferivelmente pelo menos 90% puro, conforme determinado por eletroforese em agarose.

[037] **Polinucleotídeo substancialmente puro:** O termo "polinucleotídeo substancialmente puro" como aqui usado refere-se a uma preparação de polinucleotídeo livre de outros nucleotídeos estranhos ou indesejados e em uma forma adequada para uso dentro de sistemas de produção de proteína geneticamente engenhada. Assim, um polinucleotídeo

substancialmente puro contém no máximo 10%, preferivelmente no máximo 8%, mais preferivelmente no máximo 6%, mais preferivelmente no máximo 5%, mais preferivelmente no máximo 4%, mais preferivelmente no máximo 3%, ainda mais preferivelmente no máximo 2%, muito mais preferivelmente no máximo 1%, e ainda muito mais preferivelmente no máximo 0,5% em peso de outro material de polinucleotídeo com o qual está nativamente ou recombinantemente associado. Um polinucleotídeo substancialmente puro pode, contudo, incluir regiões não-traduzidas 5' e 3' naturalmente ocorrentes, tais como promotores e terminadores. É preferível que o polinucleotídeo substancialmente puro seja pelo menos 90% puro, preferivelmente pelo menos 92% puro, mais preferivelmente pelo menos 94% puro, mais preferivelmente pelo menos 95% puro, mais preferivelmente pelo menos 96% puro, mais preferivelmente pelo menos 97% puro, ainda mais preferivelmente pelo menos 98% puro, muito mais preferivelmente pelo menos 99% puro, muito mais preferivelmente mais preferivelmente pelo menos 99,5% puro em peso. Os polinucleotídeos da presente invenção estão preferivelmente em uma forma substancialmente pura, *i.e.*, que a preparação de polinucleotídeo está essencialmente livre de outro material de polinucleotídeo com o qual está nativamente ou recombinantemente associado. Os polinucleotídeos podem ser de origem genômica, sintética, semi-sintética, cDNA, RNA, quaisquer suas combinações.

[038] **Sequência codificadora:** Quando aqui usado o termo "sequência codificadora" significa uma sequência de nucleotídeos, que diretamente especifica a sequência de aminoácidos de seu produto de proteína. Os limites da sequência codificadora são geralmente determinados por uma matriz de leitura aberta, que costumeiramente inicia com o códon de iniciação ATG ou códons de iniciação alternativos tais como GTG e TTG e extremidades de um códon de terminação tais como TAA, TAG, e TGA. A sequência codificadora pode ser um DNA, cDNA, uma sequência de

nucleotídeos sintética, ou recombinante.

[039] **cDNA:** O termo "cDNA" é aqui definido como uma molécula de DNA que pode ser preparada por transcrição reversa a partir de uma molécula de mRNA, emendada, madura obtida de uma célula eucariótica. Sequências de cDNA faltante de íntron que podem estar presentes no DNA genômico correspondente. O transcrito de RNA primário, inicial é um precursor para mRNA que é processado através de uma série de etapas antes do surgimento como mRNA emendado maduro. Estas etapas incluem a remoção de sequências de íntron por um processo chamado de emenda. cDNA derivado de mRNA é faltante, portanto, de quaisquer sequências de íntron.

[040] **Construto de ácido nucleico:** O termo "construto de ácido nucleico" como aqui usado refere-se a uma molécula de ácido nucleico, de fita quer única quer dupla, que é isolada de um gene naturalmente ocorrente ou que é modificada para conter segmentos de ácidos nucleicos em uma maneira que de outro modo não existiria na natureza ou que é sintética. O termo construto de ácido nucleico é sinônimo do termo "cassete de expressão" quando o construto de ácido nucleico contém as sequências de controle para a expressão de uma sequência codificadora da presente invenção.

[041] **Sequências de controle:** O termo "sequências de controle" é aqui definido para incluir todos os componentes necessários para a expressão de um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção. Cada sequência de controle pode ser nativa ou estranha à sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo ou mutuamente nativa ou estranha. Tais sequências de controle incluem, mas não são limitadas a, uma sequência líder, sequência de poliadenilação, sequência de propeptídeo, promotor, sequência de peptídeo de sinal, e terminador de transcrição. Em um mínimo, as sequências de controle incluem um promotor, e sinais de

terminação de transcrição e de tradução. As sequências de controle podem ser fornecidas com ligantes para o propósito de introduzir sítios de restrição específicos facilitando a ligação das sequências de controle com a sequência codificadora da sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo.

[042] **Operacionalmente ligado:** O termo "operacionalmente ligado" denota aqui uma configuração na qual uma sequência de controle está posicionada em uma posição apropriada em relação à sequência codificadora da sequência de polinucleotídeo de tal modo que a sequência de controle dirija a expressão da sequência codificadora de um polipeptídeo.

[043] **Expressão:** O termo "expressão" inclui qualquer etapa envolvida na produção do polipeptídeo incluindo, mas não limitado a, transcrição, modificação de pós-transcrição, tradução, modificação de pós-tradução, e secreção.

[044] **Vetor de expressão:** O termo "vetor de expressão" é aqui definido como uma molécula de DNA linear ou circular que compreende um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção e está operacionalmente ligado em nucleotídeos adicionais que proporcionam sua expressão.

[045] **Célula hospedeira:** O termo "célula hospedeira", como aqui usado, inclui qualquer tipo de célula que é suscetível à transformação, transfecção, transdução, e semelhantes com um construto de ácido nucleico ou vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção.

[046] **Modificação:** O termo "modificação" significa aqui qualquer modificação química do polipeptídeo consistindo do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2; ou de uma sua sequência homóloga; bem como manipulação genética do DNA codificador de um tal polipeptídeo. A modificação pode ser uma substituição, uma deleção e/ou uma inserção de um

ou mais (vários) aminoácidos bem como substituições de uma ou mais (várias) cadeias laterais de aminoácido.

[047] **Variante artificial:** Quando aqui usado, o termo "variante artificial" significa um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase produzido por um organismo expressando uma sequência de polinucleotídeo modificada da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1; ou uma sua sequência homóloga. A sequência de nucleotídeos modificada é obtida através de intervenção humana por modificação da sequência de polinucleotídeo revelada em SEQ ID NO: 1; ou uma sua sequência homóloga.

Descrição Detalhada da Invenção

Polipeptídeos Tendo Atividade de Acetil-xilano-esterase

[048] Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se aos polipeptídeos isolados compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo um grau de identidade com o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2 de preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, muito mais preferivelmente mais preferivelmente pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99%, que têm atividade de acetil-xilano-esterase (daqui em diante "polipeptídeos homólogos"). Em um aspecto preferido, os polipeptídeos homólogos têm uma sequência de aminoácidos que difere em dez aminoácidos, preferivelmente em cinco aminoácidos, mais preferivelmente em quatro aminoácidos, ainda mais preferivelmente em três aminoácidos, muito mais preferivelmente em dois aminoácidos, e ainda muito mais preferivelmente em um aminoácido do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[049] Um polipeptídeo da presente invenção preferivelmente compreenda sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou

uma sua variante alélica; ou um seu fragmento tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo compreenda sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 377 de SEQ ID NO: 2, ou uma sua variante alélica; ou um seu fragmento tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 377 de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua variante alélica; ou um seu fragmento tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo consiste de aminoácidos 20 a 377 de SEQ ID NO: 2 ou uma sua variante alélica; ou um seu fragmento tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo consiste de aminoácidos 20 a 377 de SEQ ID NO: 2.

[050] Em um segundo aspecto, a presente invenção refere-se aos polipeptídeos isolados tendo atividade de acetil-xilano-esterase que são codificados pelos polinucleotídeos que hibridizam sob condições de estringência preferivelmente muito baixa, mais preferivelmente condições de estringência baixa, mais preferivelmente condições de estringência média, mais preferivelmente condições de estringência média-alta, ainda mais preferivelmente condições de estringência alta, e muito mais preferivelmente condições de estringência muito alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (iii) uma subsequência de (i) ou (ii), ou (iv) uma fita complementar de comprimento total de (i), (ii), ou (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, e T. Maniatis, 1989,

Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York). Uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1 contém pelo menos 100 nucleotídeos contíguos ou preferivelmente pelo menos 200 nucleotídeos contíguos. Além disso, a subsequência pode codificar um fragmento de polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto preferido, a fita complementar é a fita complementar de comprimento total da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[051] A sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1; ou uma sua subsequência; bem como a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; ou um seu fragmento; pode ser usada para planejar sondas de ácido nucleico para identificar e clonar DNA codificador de polipeptídeos tendo atividade de acetil-xilano-esterase de cepas de espécies ou gêneros diferentes de acordo com métodos bem conhecidos na arte. Em particular, tais sondas podem ser usadas para hibridização com o DNA genômico ou cDNA do gênero ou da espécie de interesse, seguindo procedimentos padrão de Southern blotting, com o propósito de identificar e isolar o gene correspondente no mesmo. Tais sondas podem ser consideravelmente mais curtas do que a sequência inteira, mas devem ser de pelo menos 14, preferivelmente pelo menos 25, mais preferivelmente pelo menos 35, e muito mais preferivelmente pelo menos 70 nucleotídeos em comprimento. Contudo, é preferido que a sonda de ácido nucleico seja de pelo menos 100 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, a sonda de ácido nucleico pode ser de pelo menos 200 nucleotídeos, preferivelmente pelo menos 300 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 400 nucleotídeos, ou muito mais preferivelmente pelo menos 500 nucleotídeos em comprimento. Sondas ainda mais longas podem ser usadas, *e.g.*, sondas de ácido nucleico que são preferivelmente de pelo menos 600 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 700 nucleotídeos, ainda mais preferivelmente pelo menos 800

nucleotídeos, ou muito mais preferivelmente pelo menos 900 nucleotídeos em comprimento. Ambas as ondas de DNA e de RNA podem ser usadas. As sondas são tipicamente marcadas para detecção do gene correspondente (por exemplo, com ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina, ou avidina). Tais sondas estão incluídas na presente invenção.

[052] Uma biblioteca de cDNA ou DNA genômico preparada de tais outras cepas, portanto, pode ser selecionada para o DNA que hibridiza com as sondas descritas acima e codifica um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. DNA genômico ou outro DNA de tais outras cepas pode ser separado por eletroforese em gel de poliacrilamida ou de agarose, ou outras técnicas de separação. DNA das bibliotecas ou o DNA separado pode ser transferido para ou imobilizado sobre nitro-celulose ou outro material de suporte. Com o propósito de identificar um clone ou DNA que é homólogo com a SEQ ID NO: 1; ou uma sua subsequência; o material de suporte é preferivelmente usado em um Southern blot.

[053] Para propósitos da presente invenção, hibridização indica que a sequência de nucleotídeos hibridiza com uma sonda de ácido nucleico marcada correspondendo à sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1; a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1; sua fita complementar de comprimento total; ou uma sua subsequência; sob condições de estrigência muito baixa a muito alta. Moléculas com as quais a sonda de ácido nucleico hibridiza sob estas condições podem ser detectadas usando, por exemplo, filme de raios-X.

[054] Em um aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade preferida, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 58 a 1266 de SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade preferida, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de

SEQ ID NO: 2, ou uma sua subsequência. Em outra modalidade preferida, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade preferida, a sonda de ácido nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pHinsAXE2 que está contido em *E. coli* NRRL B-50076, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em outra modalidade preferida, a sonda de ácido nucleico é a região codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pMinsAXE2 que está condito em *E. coli* NRRL B-50076.

[055] Para sondas longas de pelo menos 100 nucleotídeos em comprimento, condições de estrigência muito baixa a muito alta são definidas como pré-hibridização e hibridização a 42°C em 5X SSPE, SDS 0,3%, 200 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado e cisalhado, e quer formamida 25% para estrigências muito baixa e baixa, formamida 35% para estrigências média e média-alta, quer formamida 50% para estrigências alta e muito alta, seguindo procedimentos padrão de Southern blotting por 12 a 24 horas otimamente.

[056] Para sondas longas de pelo menos 100 nucleotídeos em comprimento, o material de suporte é finalmente lavado três vezes cada uma por 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% SDS preferivelmente a 45°C (estrigência muito baixa), mais preferivelmente a 50°C (estrigência baixa), mais preferivelmente a 55°C (estrigência média), mais preferivelmente a 60°C (estrigência média-alta), ainda mais preferivelmente a 65°C (estrigência alta), e muito mais preferivelmente a 70°C (estrigência muito alta).

[057] Para sondas curtas de cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 70 nucleotídeos em comprimento, condições de estrigência são definidas como pré-hibridização, hibridização, e lavagem após hibridização a cerca de 5°C a cerca de 10°C abaixo da T_m calculada usando o cálculo de acordo com Bolton e McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy*

of Sciences USA 48:1390) em NaCl 0,9 M, Tris-HCl 0,09 M, pH 7,6, EDTA 6 mM, NP-40 0,5%, 1X Solução de Denhardt, pirofosfato de sódio 1 mM, fosfato de sódio monobásico 1 mM, ATP 0,1 mM, e 0,2 mg de RNA de levedura RNA por mL seguindo procedimentos padrão de Southern blotting por 12 a 24 horas otimamente.

[058] Para sondas curtas de cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 70 nucleotídeos em comprimento, o material de suporte é lavado uma vez em 6X SCC mais SDS 0,1% por 15 minutos e duas vezes cada por 15 minutos usando 6X SSC a de 5°C a 10°C abaixo de T_m calculada.

[059] Em um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se aos polipeptídeos isolados tendo atividade de acetil-xilano-esterase codificados por polinucleotídeos compreendendo ou consistindo de sequências de nucleotídeos que têm um grau de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1 de preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, muito mais preferivelmente mais preferivelmente pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99%, que codificam um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Veja aqui a seção de polinucleotídeo.

[060] Em um quarto aspecto, a presente invenção refere-se às variantes artificiais compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais (vários) aminoácidos do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2; ou uma sua sequência homóloga. Preferivelmente, mudanças de aminoácido são de uma natureza menor, isto é inserções ou substituições conservativas de aminoácido que não afetam significativamente o dobramento e/ou a atividade da proteína; deleções pequenas, tipicamente de um a cerca de

30 aminoácidos; extensões pequenas amino- ou carboxil-terminais, tal como um resíduo de metionina amino-terminal; a um peptídeo ligante pequeno de até cerca de 20-25 resíduos; ou uma extensão pequena que facilita a purificação pela mudança da carga efetiva ou de outra função, tal como uma região de poli-histamina, um epítopo antigénico ou um domínio de ligação.

[061] Exemplos de substituições conservativas estão dentro do grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina e asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina e valina), aminoácidos aromáticos (fenil-alanina, triptofano e tirosina), e aminoácidos pequenos (glicina, alanina, serina, treonina e metionina). Substituições de aminoácido que geralmente não alteram a atividade específica são conhecidas na arte e são descritas, por exemplo, por H. Neurath e R.L. Hill, 1979, em *The Proteins*, Academic Press, New York. As mudanças muito mais comumente ocorrentes são Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, e Asp/Gly.

[062] Em adição aos 20 aminoácidos padrão, aminoácidos não-padrão (tais como 4-hidróxi-prolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-amino-isobutírico, isovalina, e alfa-metil-serina) podem ser substitutos de resíduos de aminoácido de um polipeptídeo de tipo selvagem. Um número limitado de aminoácidos não-conservativos, aminoácidos que não são codificados pelo código genético, e aminoácidos não-naturais pode ser substituto de resíduos de aminoácido. "Aminoácidos não-naturais" têm sido modificados após a síntese de proteína, e/ou têm uma estrutura química em sua(s) cadeia(as) lateral(ais) diferente(s) daquela dos aminoácidos padrão. Aminoácidos não-naturais podem ser quimicamente sintetizados, e preferivelmente, estão comercialmente disponíveis, e incluem ácido pipecólico, ácido tiazolidina-carboxílico, desidroprolina, 3- e 4-metil-prolinas, e 3,3-dimetil-prolina.

[063] Alternativamente, as mudanças de aminoácido são de uma tal natureza que as propriedades físico-químicas dos polipeptídeos são alteradas. Por exemplo, as mudanças de aminoácido podem melhorar a estabilidade térmica do polipeptídeo, alterar a especificidade por substrato, a mudança do pH ótimo, e semelhantes.

[064] Aminoácidos essenciais no polipeptídeo precursora podem ser identificados de acordo com procedimentos conhecidos na arte, tais como mutagênese sítio-direcionada ou mutagênese de varredura de alanina (Cunningham e Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). Na última técnica, mutações únicas de alanina são introduzidas em cada resíduo na molécula, e as moléculas mutantes resultantes são testadas para atividade biológica (*i.e.*, atividade de acetil-xilano-esterase) para identificar resíduos de aminoácido que são críticos para a atividade da molécula. Veja também, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. O sítio ativo da enzima ou outra interação biológica também pode ser determinado(a) por análise física da estrutura, conforme determinado por técnicas tais como ressonância nuclear magnética, cristalografia, difração eletrônica, ou marcação de fotoafinidade, conjuntamente com mutação de aminoácidos de sítio de contato putativo. Veja, por exemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. As identidades de aminoácidos essenciais também podem ser inferidas das análises de identidades com polipeptídeos que estão relacionados com um polipeptídeo de acordo com a invenção.

[065] Substituições, deleções e/ou inserções únicas ou múltiplas de aminoácido podem ser realizadas e testadas usando métodos conhecidos de mutagênese, recombinação, e/ou rearranjo, seguidos por um procedimento de triagem relevante, tais como aqueles revelados por Reidhaar-Olson e Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie e Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; ou WO 95/22625. Outros

métodos que podem ser usados incluem "error-prone PCR", exibição de fago (*e.g.*, Lowman *et al.*, 1991, *Biochem.* 30: 10832-10837; Patente U.S. de Nº 5.223.409; WO 92/06204), e mutagênese região-direcionada (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46: 145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7: 127).

[066] Métodos de rearranjo / mutagênese podem ser combinados com métodos de triagem automáticos, de produtividade alta para detectar a atividade de polipeptídeos mutados, clonados expressados pelas células hospedeiras (Ness *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Moléculas de DNA mutadas que codificam os polipeptídeos ativos podem ser recuperadas das células hospedeiras e rapidamente sequenciadas usando métodos padrão na arte. Estes métodos permitem a determinação rápida da importância dos resíduos de aminoácido individuais em um polipeptídeo de interesse, e podem ser aplicados aos polipeptídeos de estrutura desconhecida.

[067] O número total de substituições, deleções e/ou inserções de aminoácido do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, tais como aminoácidos 20 a 377 de SEQ ID NO: 2, é 10, preferivelmente 9, mais preferivelmente 8, mais preferivelmente 7, mais preferivelmente no máximo 6, mais preferivelmente 5, mais preferivelmente 4, ainda mais preferivelmente 3, muito mais preferivelmente 2, e ainda muito mais preferivelmente 1.

Fontes de Polipeptídeos Tendo Atividade de Acetil-xilano-esterase

[068] Um polipeptídeo da presente invenção pode ser obtido de microorganismo de qualquer gênero. Para os propósitos da presente invenção, o termo "obtido de" como aqui usado em conexão com uma fonte dada deve significar que o polipeptídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos é produzido pela fonte ou por uma cepa na qual a sequência de nucleotídeos da fonte tem sido inserida. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo obtido de uma dada fonte é secretado extracelularmente.

[069] Um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-

esterase da presente invenção pode ser um polipeptídeo bacteriano. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo bacteriano Gram-positivo tal como polipeptídeo de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, ou *Oceanobacillus* tendo atividade de acetil-xilano-esterase, ou um polipeptídeo bacteriano Gram-negativo tal como um polipeptídeo de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, ou *Ureaplasma* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[070] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, ou *Bacillus thuringiensis* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[071] Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, ou *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[072] Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, ou *Streptomyces lividans* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[073] Um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase da presente invenção também pode ser um polipeptídeo fúngico, e mais preferivelmente um polipeptídeo de levedura tal como um polipeptídeo de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia* tendo atividade de acetil-xilano-esterase; ou mais preferivelmente um polipeptídeo de fungo filamentoso tal como um

polipeptídeo de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, ou *Xylarium* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[074] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, ou *Saccharomyces oviformis* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[075] Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium*

torulosum, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, ou *Trichoderma viride* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[076] Em outra modalidade preferida, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, ou *Humicola lanuginosum* tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[077] Em um aspecto mais preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Humicola insolens* tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto muito mais preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Humicola insolens* DSM 1800 tendo atividade de acetil-xilano-esterase, e.g., o polipeptídeo compreendendo o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[078] Será entendido que para as espécies acima mencionadas a invenção inclui ambos os estados perfeito e imperfeito, e outros equivalentes taxonômicos, e.g., anamorfos, independente do nome da espécie pelo qual elas são conhecidas. Aquelas pessoas experientes na arte reconhecerão prontamente a identidade dos equivalentes apropriados.

[079] Cepas daquelas espécies estão prontamente acessíveis ao público em numerosas coleções de culturas, tais como a "American Type Culture Collection (ATCC)", "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM)", "Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS)", e "Agricultural Research Service Patent Culture Collection", "Northern Regional Research Center (NRRL)".

[080] Ademais, tais polipeptídeos podem ser identificados

e obtidos de outras fontes incluindo microorganismos isolados da natureza (*e.g.*, solo, adubos compostos, água, etc.) usando as sondas mencionadas acima. Técnicas para o isolamento de microorganismos de habitats naturais são bem conhecidas na arte. O polinucleotídeo pode ser então obtido por triagem similar de uma biblioteca genômica ou de cDNA de um tal microorganismo. Logo que uma sequência de polinucleotídeo codificadora de um polipeptídeo tem sido detectada com a(s) sonda(s), o polinucleotídeo pode ser isolado ou clonado pelo uso de técnicas que são bem conhecidas por aquelas pessoas ordinariamente experientes na arte (veja, *e.g.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[081] Polipeptídeos da presente invenção também incluem polipeptídeos fusionados ou polipeptídeos de fusão cliváveis nos quais outro polipeptídeo está fusionado na terminação-N ou na terminação-C do polipeptídeo ou seu fragmento. Um polipeptídeo fusionado é produzido pela fusão de uma sequência de nucleotídeos (ou uma sua porção) codificadora de outro polipeptídeo em uma sequência de nucleotídeos (ou uma sua porção) da presente invenção. Técnicas para a produção de polipeptídeos de fusão são conhecidas na arte, e incluem ligação das sequências codificadoras dos polipeptídeos de modo que elas estejam em matriz e que a expressão do polipeptídeo fusionado esteja sob o controle do(s) mesmo(s) promotor(es) e terminador.

[082] Um polipeptídeo de fusão pode adicionalmente compreender um sítio de clivagem. =. Com a secreção da proteína de fusão, o sítio é clivado liberando o polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase da proteína de fusão. Exemplos de sítios de clivagem incluem, mas não são limitados a, um sítio Kex2 que codifica o dipeptídeo Lys-Arg (Martin *et al.*, 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3: 568-76; Svetina *et al.*, 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; e

Contreras *et al.*, 1991, *Biotechnology* 9: 378-381), um sítio Ile-(Glu ou Asp)-Gly-Arg site, que é clivado por uma Fator Xa protease após o resíduo de arginina (Eaton *et al.*, 1986, *Biochem.* 25: 505-512); um sítio Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, que é clivado por uma enteroquinase após a lisina (Collins-Racie *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 982-987); um sítio His-Tyr-Glu site ou His-Tyr-Asp, que é clivado por Genenase I (Carter *et al.*, 1989, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6:240-248); um sítio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que é clivado por trombina após a Arg (Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48); um sítio Glut-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, que é clivado por TEV protease após Gln (Stevens, 2003, *supra*); e um sítio Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que é clivado por uma forma geneticamente engenhada de protease de rinovírus 3C de humano após Gln (Stevens, 2003, *supra*).

Polinucleotídeos

[083] A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos isolados compreendendo ou consistindo de sequências de nucleotídeos que codificam polipeptídeos tendo atividade de acetil-xilano-esterase da presente invenção.

[084] Em um aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pHinsAXE2 que está contido em *E. coli* NRRL B-50076. Em outra modalidade preferida, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1. Em outra modalidade preferida, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de nucleotídeos 58 a 1266 de SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pHinsAXE2 que está contido em *E. coli* NRRL B-50076. A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam

polipeptídeos compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 1 ou sua sequência codificadora de polipeptídeo maduro em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 1 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 2 que têm atividade de acetil-xilano-esterase.

[085] A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos mutantes compreendendo ou consistindo de pelo menos uma mutação na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, na qual a sequência de nucleotídeos mutante codifica o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[086] As técnicas usadas para isolar ou clonar um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo são conhecidas na arte e incluem o isolamento de DNA genômico, a preparação de cDNA, ou uma sua combinação. A clonagem dos polinucleotídeos da presente invenção de tal DNA genômico pode ser realizada, e.g., pelo uso a bem conhecida reação em cadeia da polimerase (PCR) ou triagem por anticorpo de bibliotecas de expressão para detectar os fragmentos de DNA clonados com características estruturais compartilhadas. Veja, e.g., Innis *et al.*, 1990, *PCR: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York. Outros procedimentos de amplificação de ácido nucleico tais como reação em cadeia da ligas (LCR), transcrição ativada ligada (LAT) e amplificação baseada em sequência de nucleotídeos (NASBA) podem ser utilizadas. Os polinucleotídeos podem ser clonados de uma cepa de *Humicola*, ou de outro organismo ou de organismo relacionado e assim, por exemplo, podem ser uma variante alélica ou de espécie da região codificadora do polipeptídeo da sequência de nucleotídeos.

[087] A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos isolados compreendendo ou consistindo de sequências de nucleotídeos que têm um grau de identidade com a sequência codificadora de

polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1 de preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, muito mais preferivelmente mais preferivelmente pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade, que codificam um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[088] Modificação de uma sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo da presente invenção pode ser necessária para a síntese de polipeptídeos substancialmente similares ao polipeptídeo. O termo "substancialmente similar" ao polipeptídeo refere-se às formas não-naturalmente ocorrentes do polipeptídeo. Estes polipeptídeos podem diferir em alguma maneira engenhada do polipeptídeo isolado de sua fonte nativa, *e.g.*, variantes artificiais que diferem em atividade específica, termoestabilidade, pH ótimo, ou semelhante. A sequência variante pode ser construída baseando-se na sequência de nucleotídeos apresentada como a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, *e.g.*, uma sua subsequência, e/ou pela introdução de substituições de nucleotídeo que não resultam em outra sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado pela sequência de nucleotídeos, mas que corresponde ao uso de códon do organismo hospedeiro intencionado para a produção da enzima, ou pela introdução de substituições de nucleotídeo que podem resultar em uma sequência de aminoácidos diferente. Para descrição geral de substituição de nucleotídeo, veja, *e.g.*, Ford *et al.*, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

[089] Será evidente para aquelas pessoas experientes na arte que tais substituições podem ser feitas foram de regiões críticas para função da molécula a inda resultarem em um polipeptídeo ativo. Resíduos de aminoácido essenciais para a atividade do polipeptídeo codificado por um

polinucleotídeo isolado da invenção, e portanto preferivelmente não sujeitos à substituição, podem ser identificados de acordo com procedimentos conhecidos na arte, tal como mutagênese sítio-direcionada ou mutagênese de varredura de alanina (veja, e.g., Cunningham e Wells, 1989, *supra*). Na última técnica, mutações são introduzidas em cada resíduo positivamente carregado na molécula, e as moléculas resultantes são testadas para atividade de acetil-xilano-esterase para identificar os resíduos de aminoácido que são críticos para a atividade da molécula. Sítios de interação de substrato-enzima também podem ser determinados por análise da estrutura tridimensional conforme determinado por técnicas tais como análise por ressonância nuclear magnética, cristalografia ou marcação por fotoafinidade (veja, e.g., de Vos *et al.*, 1992, *supra*; Smith *et al.*, 1992, *supra*; Wlodaver *et al.*, 1992, *supra*).

[090] A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos isolados codificadores de polipeptídeos da presente invenção, que hibridizam sob condições de estringência muito baixa, preferivelmente condições de estringência baixa, mais preferivelmente condições de estringência média, mais preferivelmente condições de estringência média-alta, ainda mais preferivelmente condições de estringência alta, e muito mais preferivelmente condições de estringência muito alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii); ou variante alélicas e suas subsequências (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), como aqui definidas. Em um aspecto preferido, a fita complementar é a fita complementar de comprimento total da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[091] A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos isolados obtidos por (a) hibridização de uma população de DNA sob condições de estringência muito baixa, baixa, média, média-alta,

alta ou muito alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii); e (b) isolamento do polinucleotídeo hibridizado, que codifica um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto preferido, a fita complementar é a fita complementar de comprimento total da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

Construtos de ácido nucleico

[092] A presente invenção também se refere aos construtos de ácido nucleico compreendendo um polinucleotídeo isolado da presente invenção operacionalmente ligados em uma ou mais (várias) sequências de controle que dirigem a expressão da sequência codificadora em uma célula hospedeira adequada sob condições compatíveis com as sequências de controle.

[093] Um polinucleotídeo isolado codificador de um polipeptídeo da presente invenção pode ser manipulado em uma variedade de maneiras para proporcionar a expressão do polipeptídeo. Manipulação da sequência de polinucleotídeo antes de sua inserção em um vetor pode ser desejável ou necessária dependendo do vetor de expressão. As técnicas para modificar as sequências de polinucleotídeo utilizando métodos de DNA recombinante são bem conhecidas na arte.

[094] As sequências de controle podem ser uma sequência de promotor, uma sequência de nucleotídeos que é reconhecida por uma célula hospedeira para expressão de um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção. A sequência de promotor contém sequências de controle de transcrição que medeiam a expressão do polipeptídeo. O promotor pode ser qualquer sequência de nucleotídeos que mostra atividade transcricional na célula hospedeira de escolha incluindo

promotores mutantes, truncados, e híbridos, e pode ser obtido de genes codificadores de polipeptídeos extracelulares ou intracelulares quer homólogos quer heterólogos à célula hospedeira.

[095] Exemplos de promotores adequados para dirigir a transcrição dos construtos de ácido nucleico da presente invenção, especialmente em uma célula hospedeira bacteriana, são os promotores obtidos do operon *lac* de *E. coli*, gene de agarase de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), gene de levansucrase de *Bacillus subtilis* (*sacfi*), gene de alfa-amilase de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gene de amilase maltogênica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gene de alfa-amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gene de penicilinase de *Bacillus licheniformis* (*penP*), genes *xylA* e *xylB* de *Bacillus subtilis*, e gene de beta-lactamase procariótico (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731), bem como o promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25). Outros promotores são descritos em "Useful proteins from recombinant bacteria" em *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; e em Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

[096] Exemplos de promotores adequados para dirigir a transcrição dos construtos de ácido nucleico da presente invenção em uma célula hospedeira fúngica filamentosa são promotores obtidos dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilase estável a ácido de *Aspergillus niger*, glicoamilase de *Aspergillus niger* ou *Aspergillus awamori* (*glaA*), lipase de *Rhizomucor miehei*, fosfatase alcalina de *Aspergillus oryzae*, triose fosfato isomerase de *Aspergillus oryzae*, acetamidase de *Aspergillus nidulans*, amiloglicosidase de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), tripsina-semelhante protease de

Fusarium oxysporum (WO 96/00787), beta-glicosidase de *Trichoderma reesei*, celobio-hidrolase I de *Trichoderma reesei*, celobio-hidrolase II de *Trichoderma reesei*, endoglucanase I de *Trichoderma reesei*, endoglicanase II de *Trichoderma reesei*, endoglicanase III de *Trichoderma reesei*, endoglicanase IV de *Trichoderma reesei*, endoglicanase V de *Trichoderma reesei*, xilanase I de *Trichoderma reesei*, xilanase II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidase de *Trichoderma reesei*, bem como o promotor NA2-tpi (um híbrido dos promotores dos genes para alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger* e triose fosfato isomerase de *Aspergillus oryzae*); e seus promotores mutantes, truncados, e híbridos.

[097] Em uma levedura hospedeira, promotores úteis são obtidos dos genes para enolase de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactoqueinase de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), álcool desidrogenase / gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triose fosfato isomerase de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), e 3-fosfo-glicerato quinase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outros promotores úteis para células hospedeiras de levedura são descritos por Romanos *et al.*, 1992, *Yeast*8: 423-488.

[098] A sequência de controle também pode ser uma sequência de terminador de transcrição adequada, uma sequência reconhecida pela célula hospedeira para terminar a transcrição. A sequência de terminador está operacionalmente ligada na terminação 3' da sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo. Qualquer terminador que seja funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usado na presente invenção.

Terminadores preferidos para células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidos dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*, alfa-glicosidase de *Aspergillus niger*, e tripsina-semelhante protease

de *Fusarium oxysporum*.

[0099] Terminadores preferidos para células hospedeiras de levedura são obtidos dos genes para enolase de *Saccharomyces cerevisiae*, citocrome C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outros terminadores úteis para células hospedeiras de levedura são descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0100] A sequência de controle também pode ser uma sequência líder adequada, uma região não-traduzida de um mRNA que é importante para tradução pela célula hospedeira. A sequência líder está operacionalmente ligada na terminação 5' da sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo. Qualquer sequência líder que seja funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usada na presente invenção.

[0101] Líderes preferidos para células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidas dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae* e triose fosfato isomerase de *Aspergillus nidulans*.

[0102] Líderes adequados para células hospedeiras de levedura são obtidos dos genes para enolase de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfo-glicerato quinase de *Saccharomyces cerevisiae*, fator-alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, e álcool desidrogenase / gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0103] A sequência de controle também pode ser uma sequência de poliadenilação, uma sequência operacionalmente ligada na terminação-3' da sequência de nucleotídeos e, quando transcrita, é reconhecida pela célula hospedeira como um sinal para adicionar resíduos de poliadenosina no mRNA transcrito. Qualquer sequência de poliadenilação que é funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usada na presente invenção.

[0104] Sequências de poliadenilação preferidas para as

células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidas dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*, tripsina-semelhante protease de *Fusarium oxysporum*, e alfa-glucosidase de *Aspergillus niger*.

[0105] Sequências de poliadenilação úteis para células hospedeiras de levedura são descritas por Guo e Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0106] A sequência de controle também pode ser uma sequência codificadora de peptídeo de sinal que codifica uma sequência de aminoácidos ligada a uma terminação amino de um polipeptídeo e dirige o polipeptídeo codificado para dentro da rota secretória da célula. A extremidade 5' da sequência codificadora da sequência de nucleotídeos pode inerentemente conter uma sequência codificadora de peptídeo de sinal naturalmente ligada em matriz de leitura de tradução com o segmento da sequência codificadora que codifica o polipeptídeo secretado. Alternativamente, a extremidade 5' da sequência codificadora pode conter uma sequência codificadora de peptídeo de sinal que é estranha à sequência codificadora. A sequência codificadora de peptídeo de sinal estranha naturalmente não contém uma sequência codificadora de peptídeo de sinal. Alternativamente, a sequência codificadora de peptídeo de sinal estranha pode simplesmente substituir a sequência codificadora de peptídeo de sinal natural com o propósito de intensificar a secreção do polipeptídeo. Contudo, qualquer sequência codificadora de peptídeo de sinal que dirige o polipeptídeo expressado para dentro da rota secretória da célula hospedeira de escolha, *i.e.*, secretado para dentro de um meio de cultura, pode ser usada na presente invenção.

[0107] Sequências codificadoras de peptídeo de sinal eficazes para células hospedeiras bacterianas são as sequências codificadoras de peptídeo de sinal obtidas dos genes para amilase maltogênica de *Bacillus*

NCIB 11837, alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamase de *Bacillus licheniformis*, proteases neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), e *prsA* de *Bacillus subtilis*. Outros peptídeos de sinal são descritos por Simonen e Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57:109-137.

[0108] Sequências codificadoras de peptídeo de sinal eficazes para células hospedeiras fúngicas filamentosas são as sequências codificadoras de peptídeo de sinal obtidas dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, amilase neutra de *Aspergillus niger*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulase de *Humicola insolens*, endoglucanase V de *Humicola insolens*, e lipase de *Humicola lanuginosa*.

[0109] Peptídeos de sinal úteis para células hospedeiras de levedura são obtidas dos genes para fator-alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outras sequências codificadoras de peptídeo de sinal úteis são descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0110] Em um aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste de aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade preferida, a sequência codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 1 a 57 de SEQ ID NO: 1.

[0111] A sequência de controle também pode ser uma sequência codificadora de propeptídeo que codifica uma sequência de aminoácidos posicionada na terminação amino de um polipeptídeo. O polipeptídeo resultante é conhecido como uma proenzima ou um propolipeptídeo (ou um zimogênio em alguns casos). Um propeptídeo é geralmente inativo e pode ser convertido em um polipeptídeo ativo maduro por clivagem catalítica ou autocatalítica do propeptídeo a partir do propolipeptídeo. A sequência codificadora de propeptídeo pode ser obtida dos genes para protease alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), protease neutra de

Bacillus subtilis (*nprT*), fator-alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, e lacase de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0112] Se ambas as sequências de peptídeo de sinal e de propeptídeo estiverem presentes na terminação amino de um polipeptídeo, a sequência de propeptídeo estará posicionada ao lado da terminação amino de um polipeptídeo e sequência de peptídeo de sinal estará posicionada ao lado da terminação amino da sequência de propeptídeo.

[0113] Também pode ser desejável adicionar sequências regulatórias que permitem a regulação da expressão do polipeptídeo em relação ao crescimento da célula hospedeira. Exemplos de sistemas regulatórios são aqueles que causam a ligação e o desligamento da expressão do gene em resposta a um estímulo químico ou físico, incluindo a presença de um composto regulatório. Sistemas regulatórios em sistemas procarióticos incluem os sistemas de operador *lac*, *tac*, e *trp*. Em levedura, o sistema ADH2 ou sistema GAL1 podem ser usados. Em fungos filamentosos, o promotor de TAKA alfa-amilase, o promotor de glicoamilase de *Aspergillus niger*, e o promotor de glicoamilase de *Aspergillus oryzae* podem ser usados como sequências regulatórias. Outros exemplos de sequências regulatórias são aqueles que permitem a amplificação de gene. Em sistemas eucarióticos, estas sequências regulatórias incluem o gene de di-hidro-folato redutase que é amplificado na presença de metotrexato, e os genes de metalotioneína que são amplificados com metais pesados. Nestes casos, a sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo seria operacionalmente ligada com a sequência regulatória.

Vetores de expressão

[0114] A presente invenção também se refere aos vetores de expressão recombinantes compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção, um promotor, e sinais de terminação de transcrição e de tradução.

Os vários ácidos nucleicos e sequências de controle aqui descritos podem ser unidos juntos para produzirem um vetor de expressão recombinante que pode incluir um ou mais (vários) sítios de restrição convenientes para permitir a inserção ou substituição da sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo em tais sítios. Alternativamente, uma sequência de polinucleotídeo da presente invenção pode ser expressada pela inserção da sequência de nucleotídeos ou de um construto de ácido nucleico compreendendo a sequência em um vetor apropriado para expressão. Na criação do vetor de expressão, a sequência codificadora é localizada no vetor de modo que a sequência codificadora seja operacionalmente ligada com as sequências de controle apropriadas para a expressão.

[0115] O vetor de expressão recombinante pode ser qualquer vetor (e.g., um plasmídeo ou vírus) que pode ser convenientemente submetido aos procedimentos de DNA recombinante e pode resultar na expressão da sequência de nucleotídeos. A escolha do vetor tipicamente dependerá da compatibilidade do vetor com a célula hospedeira na qual o vetor é para ser introduzido. Os vetores podem ser plasmídeos lineares ou plasmídeos circulares fechados.

[0116] O vetor pode ser um vetor autonomamente replicante, *i.e.*, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, cuja replicação é independente da replicação cromossômica, e.g., um plasmídeo, um elemento extracromossômico, um minicromossomo, ou um cromossomo artificial. O vetor pode conter alguns meios para assegurar a auto-replicação. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado junto com o(s) cromossomo(s) no(s) qual(ais) ele tem sido integrado. Ademais, um único vetor ou plasmídeo ou dois ou mais vetores ou plasmídeos que juntos contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula hospedeira, ou um transposon, podem ser utilizados.

[0117] Os vetores da presente invenção preferivelmente contêm um ou mais (vários) marcadores selecionáveis que permitem a fácil seleção de células transformadas, transfectadas, transduzidas, ou semelhantes. Um marcador selecionável é um gene cujo produto fornece uma resistência viral ou a biocida, resistência a metais pesados, prototrofia ou auxotrofos, e semelhantes.

[0118] Exemplos de marcadores selecionáveis bacterianos são os genes *dal* de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus licheniformis*, ou marcadores que concedem resistência a antibiótico tais como resistência à ampicilina, à canamicina, ao cloranfenicol, ou à tetraciclina. Marcadores adequados para células hospedeiras de levedura são ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, e URA3. Marcadores selecionáveis para uso em uma célula hospedeira fúngica filamentosa incluem, mas não são limitados a, *amdS* (acetamidase), *argB* (ornitina carbamoiltransferase), *bar* (fosfinotricina acetiltransferase), *hph* (higromicina fosfotransferase), *niaD* (nitrato reducatase), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilase), *sC* (sulfato adeniltransferase), e *trpC* (antranilato sintase), bem como seus equivalentes. Preferidos para uso em uma célula de *Aspergillus* são os genes *amdS* e *pyrG* de *Aspergillus nidulans* ou *Aspergillus oryzae* e o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0119] Os vetores da presente invenção preferivelmente contêm um elemento(s) que permite a integração do vetor no genoma da célula hospedeira ou a replicação autônoma do vetor na célula independente do genoma.

[0120] Para a integração no genoma da célula hospedeira, o vetor pode basear-se na sequência de polinucleotídeo codificadora do polipeptídeo ou de qualquer outro elemento do vetor para integração no genoma por recombinação homóloga ou heteróloga. Alternativamente, o vetor pode conter sequências de nucleotídeos adicionais para dirigir a integração por recombinação homóloga no genoma da célula hospedeira em uma

localização(ões) precisa(s) no(s) cromossomo(s). Para aumentar a possibilidade de integração em uma localização precisa, os elementos de integração devem preferivelmente conter um número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferivelmente 400 a 10.000 pares de bases, e muito mais preferivelmente 800 a 10.000 pares de bases, que têm um grau elevado de identidade com a sequência alvo para intensificar a probabilidade de recombinação homóloga. Os elementos de integração podem ser qualquer sequência que é homóloga com a sequência alvo no genoma da célula hospedeira. Ademais, os elementos de integração podem ser sequências de nucleotídeos codificadoras ou não-codificadoras. Por outro lado, o vetor pode ser integrado no genoma da célula hospedeira por recombinação heteróloga.

[0121] Para replicação autônoma, o vetor pode adicionalmente compreender uma origem de replicação permitindo que o vetor se replique autonomamente na célula hospedeira em questão. A origem de replicação pode ser qualquer replicador de plasmídeo mediando a replicação autônoma que funciona em uma célula. O termo "origem de replicação" ou "replicador de plasmídeo" é aqui definido como uma sequência de nucleotídeos que permite que o plasmídeo ou o vetor se replique *in vivo*.

[0122] Exemplos de origens de replicação bacterianas são as origens de replicação de plasmídeos pBR322, pUC19, pACYC177, e pACYC184 permitindo a replicação em *E. coli*, e pUB110, pE194, pTA1060, e pAMU1 permitindo a replicação em *Bacillus*.

[0123] Exemplos de origens de replicação para uso em uma célula hospedeira de levedura são a origem de replicação de 2 micrômetros, ARS1, ARS4, a combinação de ARS1 e CEN3, e a combinação de ARS4 e CEN6.

[0124] Exemplos de origens de replicação úteis em células fúngicas filamentosas são AMA1 e ANSI (Gems *et al.*, 1991, *Gene* 98: 61-67;

Cullen *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163-9175; WO 00/24883). Isolamento do gene AMA1 e construção de plasmídeos ou vetores compreendendo o gene podem ser realizados de acordo com os métodos revelados em WO 00/24883.

[0125] Mais do que uma cópia de um polinucleotídeo da presente invenção pode ser inserida em uma célula hospedeira para aumentar a produção do produto de gene. Um aumento no número de cópias do polinucleotídeo pode ser obtido pela integração de pelo menos uma cópia adicional da sequência no genoma da célula hospedeira ou pela inclusão de um gene marcador selecionável amplificável com o polinucleotídeo onde as células contendo as cópias amplificadas do gene marcador selecionável, e deste modo as cópias adicionais do polinucleotídeo, podem ser selecionadas pelo cultivo das células na presença do agente selecionável apropriado.

[0126] Os procedimentos usados para ligar os elementos descritos acima para construir os vetores de expressão recombinantes da presente invenção são bem conhecidos por uma pessoa experiente na arte (veja, *e.g.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células hospedeiras

[0127] A presente invenção também se refere às células hospedeiras recombinantes, compreendendo um polinucleotídeo isolado da presente invenção, que são vantajosamente usadas na produção recombinante dos polipeptídeos. Um vetor compreendendo um polinucleotídeo da presente invenção é introduzido em uma célula hospedeira de modo que o vetor seja mantido como um integrante cromossômico ou como um vetor extracromossômico auto-replicante como descrito previamente. O termo "célula hospedeira" inclui qualquer progênie de uma célula precursora que não é idêntica à célula precursora devido às mutações que ocorrem durante a replicação. A escolha de uma célula hospedeira dependerá em uma grande extensão do gene codificador do polipeptídeo e de sua fonte.

[0128] A célula hospedeira pode ser qualquer célula útil na produção recombinante de um polipeptídeo da presente invenção, e.g., um procarioto ou um eucarioto.

[0129] A célula hospedeira procariótica pode ser qualquer bactéria Gram-positiva ou uma bactéria Gram-negativa. Bactérias Gram-positivas incluem, mas não são limitadas a, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, e *Oceanobacillus*. Bactérias Gram-negativas incluem, mas não são limitadas a, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, e *Ureaplasma*.

[0130] A célula hospedeira bacteriana pode ser qualquer célula de *Bacillus*. Células de *Bacillus* úteis na prática da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, e *Bacillus thuringiensis*.

[0131] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus subtilis*. Em um aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus amyloliquefaciens* cell. Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus clausii*. Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus licheniformis*. Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula *Bacillus subtilis*.

[0132] A célula hospedeira bacteriana também pode ser qualquer célula de *Streptococcus*. Células de *Streptococcus* úteis na prática da

presente invenção incluem, mas não são limitadas a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, e *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[0133] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus equisimilis*. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus pyogenes*. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus uberis*. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[0134] A célula hospedeira bacteriana também pode ser qualquer célula de *Streptomyces*. Células de *Streptomyces* úteis na prática da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, e *Streptomyces lividans*.

[0135] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces achromogenes*. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces avermitilis*. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces coelicolor*. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces griseus*. Em outra modalidade preferida, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces lividans*.

[0136] A introdução de DNA é uma célula de *Bacillus* pode, por exemplo, ser realizada por transformação de protoplasto (veja, e.g., Chang e Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168:111-115), pelo uso de células competentes (veja, e.g., Young e Spizizen, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, ou Dubnau e Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), por eletroporação (veja, e.g., Shigekawa e

Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), ou por conjugação (veja, e.g., Koehler e Thome, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5271-5278). A introdução de DNA em uma célula de *E. coli* pode, por exemplo, ser realizada por transformação de protoplasto (veja, e.g., Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) ou eletroporação (veja, e.g., Dower *et al.*, 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145). A introdução de DNA em uma célula de *Streptomyces* pode ser, por exemplo, realizada por transformação de protoplasto e eletroporação (veja, e.g., Gong *et al.*, 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), por conjugação (veja, e.g., Mazodier *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585), ou por transdução (veja, e.g., Burke *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294). A introdução de DNA em uma célula de *Pseudomonas* pode ser, por exemplo, realizada por eletroporação (veja, e.g., Choi *et al.*, 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) ou por conjugação (veja, e.g., Pinedo e Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57). A introdução de DNA em uma célula de *Streptococcus* pode ser, por exemplo, realizada por competência natural (veja, e.g., Perry and Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32:1295-1297), por transformação de protoplasto (veja, e.g., Catt e Jollick, 1991, *Microbios.* 68:189-2070, por eletroporação (veja, e.g., Buckley *et al.*, 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804) ou por conjugação (veja, e.g., Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436). Contudo, qualquer método conhecido na arte para introdução de DNA em uma célula hospedeira pode ser usado.

[0137] A célula hospedeira também pode ser um eucarioto, tal como uma célula de mamífero, de inseto, de planta, ou de fungo.

[0138] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira é uma célula fúngica. "Fungos" como aqui usado inclui os filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, e Zygomycota (como definidos por Hawksworth *et al.*, em, *Ainsworth and Blsby's Dictionary of The Fungi*, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) bem

como os Oomycota (como citados em Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, página 171) e todos os fungos mitospóricos (Hawksworth *etal.*, 1995, *supra*).

[0139] Em um aspecto mais preferido, a célula hospedeira fúngica é uma célula de levedura. "Levedura" como aqui usada inclui levedura ascosporogenosa (Endomycetales), leveduras basidiosporogenosa, e levedura pertencendo aos Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Visto que a classificação de levedura pode mudar no futuro, para os propósitos desta invenção, levedura deve ser definida como descrito em *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., e Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series* No. 9, 1980).

[0140] Em um aspecto ainda mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yanowia*.

[0141] Em um aspecto ainda muito mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, ou *Saccharomyces oviformis*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Kluyveromyces lactis*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0142] Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira fúngica é uma célula fúngica filamentosa. "Fungos filamentosos" incluem todas as formas filamentosas da subdivisão Eumycota e Oomycota (conforme definido por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Os fungos filamentosos são geralmente caracterizados por uma parece micelial composta de quitina, celulose, glicano, quitosana, manana, e polissacarídeos complexos. Crescimento vegetativo é por alongamento hifal e catabolismo de carbono obrigatoriamente aeróbico, Em contraste, crescimento vegetativo por

leveduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* é por germinação de uma talo unicelular e catabolismo de carbono pode ser fermentativo.

[0143] Em um aspecto ainda mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypodadium*, *Trametes*, ou *Trichoderma*.

[0144] Em um aspecto ainda muito mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus oryzae*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, ou *Fusarium venenatum*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus*

hirsutus, *Humioola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Fleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, ou *Trichoderma viride*.

[0145] Células fúngicas podem ser transformadas por um processo envolvendo formação de protoplasto, transformação dos protoplastos, e regeneração da parede celular em uma maneira *per se* conhecida. Procedimentos adequados para transformação de células hospedeiras de *Aspergillus* e *Trichoderma* são descritos em EP 238 023 e Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Métodos adequados para transformação de espécie *Fusarium* são descritos por Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156, e WO 96/00787. Levedura pode ser transformada usando os procedimentos descritos por Becker e Guarente, em Abelson, J.N. e Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ho *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; e Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:1920.

Métodos de Produção

[0146] A presente invenção também se refere aos métodos de produzir um polipeptídeo da presente invenção, compreendendo: (a) cultivar uma célula, que em sua forma de tipo selvagem produz o polipeptídeo, sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo. Em um aspecto preferido, a célula é do gênero *Humicola*. Em um aspecto mais preferido, a célula é *Humicola insolens*. Em um aspecto ainda muito mais preferido, a célula é *Humicola insolens* DSM 1800.

[0147] A presente invenção também se refere aos métodos de produzir um polipeptídeo da presente invenção, compreendendo: (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante, como aqui descrito, sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[0148] A presente invenção também se refere aos métodos de produzir um polipeptídeo da presente invenção, compreendendo: (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante sob condições conducentes à produção do polipeptídeo, sendo que a célula hospedeira compreende uma sequência de nucleotídeos mutante tendo pelo menos uma mutação na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, sendo que a sequência de nucleotídeos mutante codifica um polipeptídeo que compreende ou consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[0149] Nos métodos de produção da presente invenção, as células são cultivadas em um meio nutriente adequado para a produção do polipeptídeo usando métodos bem conhecidos na arte. Por exemplo, a célula pode ser cultivada por cultura em frasco agitado, e por fermentação em escala pequena ou em escala grande (incluindo fermentações no estado sólido, em batelada alimentada, ou em batelada) em fermentadores de laboratório ou industriais realizada em um meio e sob condições que permitem que o polipeptídeo seja expressado e/ou isolado. O cultivo ocorre em um meio nutriente adequado compreendendo fontes de carbono e de nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na arte. Meios adequados estão disponíveis em fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (e.g., em catálogos da "American Type Culture Collection"). Se o polipeptídeo é secretado para dentro do meio nutriente, o polipeptídeo pode ser recuperado diretamente do meio. Se o polipeptídeo não é secretado para dentro do meio, ele pode ser recuperado dos

lisados celulares.

[0150] Os polipeptídeos podem ser detectados usando métodos conhecidos na arte que são específicos para os polipeptídeos. Estes métodos de detecção incluem o uso de anticorpos específicos, a formação de um produto de enzima, ou o desaparecimento de um substrato de enzima. Por exemplo, um ensaio enzimático pode ser usado para determinar a atividade do polipeptídeo como aqui descrito.

[0151] O polipeptídeo resultante pode ser recuperado usando métodos conhecidos na arte. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser recuperado do meio nutriente por procedimentos convencionais incluindo, mas não limitados a, centrifugação, filtração, extração, secagem por pulverização, evaporação ou precipitação.

[0152] Os polipeptídeos da presente invenção podem ser purificados por uma variedade de procedimentos conhecidos na arte incluindo, mas não limitados à, cromatografia (e.g., troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização, e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (e.g., focalização isoeletrica reparativa), solubilidade diferencial (e.g., precipitação com sulfato de amônio), SDS-PAGE, ou extração (veja, e.g., *Protein Purification*, J.-C. Janson e Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obter os polipeptídeos substancialmente puros.

Plantas

[0153] A presente invenção também se refere às plantas, e.g., uma planta transgênica, parte de planta transgênica, ou célula de planta transgênica, compreendendo um polinucleotídeo isolado codificador de um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase da presente invenção de modo a expressar e produzir o polipeptídeo em quantidades recuperáveis. O polipeptídeo pode ser recuperado da planta ou parte de planta. Alternativamente, a planta ou parte de planta contendo o polipeptídeo

recombinante pode ser usada de tal modo a melhorar a qualidade de um alimento ou de uma ração, e.g., melhorar o valor nutricional, a palatabilidade, e as propriedades reológicas, ou para destruir um fator antinutritivo.

[0154] A planta transgênica pode ser dicotiledônea (uma dicot) ou monocotiledônea (uma monocot). Exemplos de plantas monocot são gramíneas, tais como grama do prado ("blue grass", *Poa*), gramínea de forragem tal como *Festuca*, *Lolium*, gramínea de clima temperado tal como, *Agrostis*, e cereais, e.g., trigo, aveia, centeio, cevada, arroz, sorgo, e milho (*Zea mays*).

[0155] Exemplos de plantas dicot são tabaco, legumes, tais como tremoços, batateira, beterraba de açúcar, ervilha, feijão e feijão-soja, e plantas crucíferas (família *Brassicaceae*), tais como couve-flor, colza, e o organismo modelo intimamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0156] Exemplos de partes de planta são caule, calo, folhas, raiz, frutas, sementes, e tubérculos bem como os tecidos individuais compreendendo estas partes, e.g., epiderme, mesofilo, parênquima, tecidos vasculares, meristemas. Compartimentos de célula de planta específicos, tais como cloroplastos, apoplastos, mitocôndria, vacúolos, peroxissomos e citoplasma também são considerados como uma parte de planta. Ademais, qualquer célula de planta, seja qual for a origem do tecido, é considerada como uma parte de planta. Igualmente, partes de planta tais como tecidos específicos e células específicas isolados(as) para facilitar a utilização da invenção também são considerados partes de planta, e.g., embriões, endospermas, aleurona e capas de sementes.

[0157] Também está incluída no escopo da presente invenção a progênie de tais plantas, partes de planta, e células de planta.

[0158] A célula de planta ou planta transgênica expressando um polipeptídeo da presente invenção pode ser construída de acordo com métodos conhecidos na arte. Em resumo, a planta ou célula de planta é

construída pela incorporação de um ou mais (vários) construtos de expressão codificadores de um polipeptídeo da presente invenção para dentro do genoma da planta hospedeira ou do genoma de cloroplasto e propagação da célula de planta ou da planta modificada em uma célula de planta ou planta transgênica.

[0159] O construto de expressão é convenientemente um construto de ácido nucleico que compreende um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção operacionalmente ligado com sequências regulatórias apropriadas exigidas para a expressão da sequência de nucleotídeos na planta ou parte de planta de escolha. Ademais, o construto de expressão pode compreender um marcador selecionável útil para identificar as células hospedeiras dentro das quais o construto de expressão tem estado integrado e as sequências de DNA necessárias para a introdução do construto na planta em questão (a última depende do método de introdução de DNA a ser usado).

[0160] A escolha das sequências regulatórias, tais como as sequências de promotor e de terminador e opcionalmente as sequências de trânsito ou de sinal é determinada, por exemplo, tendo por base quando, onde, e como o polipeptídeo é desejado para ser expressado. Por exemplo, a expressão do gene codificador de um polipeptídeo da presente invenção pode ser constitutiva ou induzível, ou pode ser desenvolvvente, em estágio ou específica para tecido, e o produto pode ser selecionado para um tecido específico ou uma parte de planta específica tal como sementes ou folhas. Sequências regulatórias são, por exemplo, descritas por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0161] Para expressão constitutiva, o promotor 35S-CaMV, o promotor de ubiquitina 1 de milho, e o promotor de actina 1 de arroz podem ser usados (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294, Christensen *et al.*, 1992, *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689; Zhang *et al.*, 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165).

Promotores específicos para órgão podem ser, por exemplo, um promotor de tecidos de dreno de armazenagem tais como sementes, tubérculos de batateira, e frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), ou de tecidos de dreno metabólicos tais como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), um promotor específico para semente tal como o promotor de glutelina, de prolamina, de globulina, ou de albumina de arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), um promotor de *Vicia fabum* da legumina B4 e o gene de proteína de semente desconhecido de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), um promotor de uma proteína de corpo de óleo de semente (Chen *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), o promotor de proteína de armazenagem *napA* de *Brassica napus*, ou qualquer outro promotor específico de semente conhecido na arte, *e.g.*, como descrito em WO 91/14772. Ademais, o promotor pode ser um promotor específico de folha tal como o promotor *rbcS* de arroz ou de tomateiro (Kyoizuka *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), o promotor de gene de adenina metiltransferase de vírus *chlorella* (Mitra e Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), ou o promotor de gene *aldP* de arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), ou um promotor induzível por fermento tal como o promotor *pin2* de batateira (Xu *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Igualmente, o promotor pode ser induzível por tratamentos abióticos tais como temperatura, estiagem, ou alterações em salinidade ou induzido por substâncias exogenamente aplicadas que ativam o promotor, *e.g.*, etanol, estrogênios, hormônios de planta tais como etileno, ácido abscísico, e ácido giberélico, e metais pesados.

[0162] Um elemento intensificador de promotor também pode ser usado para realizar expressão mais alta de um polipeptídeo da presente invenção na planta. Por exemplo, o elemento intensificador do promotor pode ser um íntron que está posicionado entre o promotor e a

sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo da presente invenção. Por exemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra*, revelam o uso do primeiro íntron do gene de actina 1 de arroz para intensificar a expressão.

[0163] O gene marcador selecionável e quaisquer outras partes do construto de expressão podem ser escolhido(as) daquele(as) disponível(eis) na arte.

[0164] O construto de ácido nucleico é incorporado no genoma da planta de acordo com técnicas convencionais conhecidas na arte, incluindo transformação mediada por *Agrobacterium*, transformação mediada por vírus, microinjeção, bombardeio de partículas, transformação biolística, e eletroporação (Gasser *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

[0165] Presentemente, transferência de gene mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é o método escolhido para geração de dicots transgênicas (para revisão, veja Hooykas e Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38) e também pode ser usada para transformar monocots, embora outros métodos de transformação sejam frequentemente usados para estas plantas. Presentemente, o método escolhido para geração de monocots transgênicas é bombardeio de partículas (partículas microscópicas de ouro ou de tungstênio revestidas com o DNA transformante) de caules embrionários ou embriões desenvolventes (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Um método alternativo para transformação de monocots é baseado na transformação de protoplasto como descrito por Omirulleh *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

[0166] Após transformação, os transformantes tendo incorporado o construto de expressão são selecionados e regenerados em plantas inteiras de acordo com métodos bem conhecidos na arte. Frequentemente o procedimento de transformação é planejado para a

eliminação seletiva de genes de seleção quer durante a regeneração quer nas gerações seguintes pelo uso de, por exemplo, co-transformação com dois construtos de T-DNA separados ou excisão específica de sítio do gene de seleção por uma recombinase específica.

[0167] A presente invenção também se refere aos métodos de produzir um polipeptídeo da presente invenção compreendendo: (a) cultivar uma célula de planta ou uma planta transgênica compreendendo um polinucleotídeo codificador do polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase da presente invenção sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

Remoção ou Redução de Atividade de Acetil-xilano-esterase

[0168] A presente invenção também se refere aos métodos de produzir um mutante de uma célula precursora, que compreende disruptar ou deletar uma sequência de polinucleotídeo, ou uma sua porção, codificadora de um polipeptídeo da presente invenção, que resulta na célula mutante produzindo menos do polipeptídeo do que a célula precursora quando cultivada sob as mesmas condições.

[0169] A célula mutante pode ser construída por redução ou eliminação da expressão de uma sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo da presente invenção usando métodos bem conhecidos na arte, por exemplo, inserções, disruptões, substituições, ou deleções. Em um aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos está inativada. A sequência de nucleotídeos a ser modificada ou inativada pode ser, por exemplo, a região codificadora ou uma sua parte essencial para atividade, ou um elemento regulatório exigido para a expressão da região codificadora. Um exemplo de uma tal sequência regulatória ou de controle pode ser uma sequência de promotor ou uma sua parte funcional, *i.e.*, uma parte que é suficiente para afetar a expressão da sequência de nucleotídeos. Outras sequências de

controle para modificação possível incluem, mas não são limitadas a, uma sequência líder, sequência de poliadenilação, sequência de propeptídeo, sequência de peptídeo de sinal, terminador de transcrição, e ativador transcricional.

[0170] Modificação ou inativação da sequência de nucleotídeos pode ser conduzida pela sujeição da célula precursora à mutagênese e pela seleção de células mutantes nas quais a expressão da sequência de nucleotídeos tem sido reduzida ou eliminada. A mutagênese, que pode ser específica ou aleatória, pode ser realizada, por exemplo, pelo uso de um agente mutagênico químico ou físico adequado, pelo uso de um oligonucleotídeo adequado, ou pela sujeição da sequência de DNA à mutagênese gerada por PCR. Ademais, a mutagênese pode ser realizada pelo uso de qualquer combinação destes agentes mutagênicos.

[0171] Exemplos de um agente mutagênico físico ou químico adequado para o presente propósito incluem irradiação ultravioleta (UV), hidroxil-amina, N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (MNNG), O-metil-hidroxil-amina, ácido nitroso, metano-sulfonato de etila (EMS), bissulfito de sódio, ácido fórmico, e análogos de nucleotídeo.

[0172] Quando tais agentes são usados, a mutagênese é tipicamente realizada pela incubação da célula precursora a ser mutada na presença do agente mutagênico escolhido sob condições adequadas, e triagem e/ou seleção de células mutantes exibindo expressão reduzida ou nenhuma expressão do gene.

[0173] Modificação ou inativação da sequência de nucleotídeos pode ser realizada pela introdução, substituição, ou remoção de um ou mais (vários) nucleotídeos no gene ou um elemento regulatório necessário para a sua transcrição ou tradução. Por exemplo, nucleotídeos podem ser inseridos ou removidos de modo a resultar na introdução de um códon de terminação, a remoção do códon de iniciação, ou uma mudança na

matriz de leitura aberta. Tal modificação ou inativação pode ser realizada por mutagênese sítio-direcionada ou por mutagênese gerada por PCR de acordo com métodos conhecidos na arte. Embora, em princípio, a modificação possa ser realizada *in vivo*, *i.e.*, diretamente na célula expressando a sequência de nucleotídeos a ser modificada, é preferido que a modificação seja conduzida *in vitro* como exemplificado abaixo.

[0174] Um exemplo de uma maneira conveniente para eliminar ou reduzir a expressão de uma sequência de nucleotídeos por uma célula é baseada em técnicas de substituição de gene, deleção de gene, ou interrupção de gene. Por exemplo, no método de interrupção de gene, a sequência de ácido nucleico correspondendo à sequência de nucleotídeos endógena é mutada *in vitro* para produzir uma sequência de ácido nucleico defectiva que é então transformada na célula precursora para produzir um gene defectivo. Por recombinação homóloga, a sequência de ácido nucleico defectiva substitui a sequência de nucleotídeos endógena. Pode ser desejável que a sequência de nucleotídeos defectiva também codifique um marcador que pode ser usado para seleção de transformantes nos quais a sequência de nucleotídeos tem estado modificada ou destruída. Em um aspecto particularmente preferido, a sequência de nucleotídeos é disruptada com um marcador selecionável tal como aqueles aqui descritos.

[0175] Alternativamente, modificação ou inativação da sequência de nucleotídeos pode ser realizada por técnicas de RNAi ou de anti-senso estabelecidas usando uma sequência complementar à sequência de nucleotídeos. Mais especificamente, expressão da sequência de nucleotídeos por uma célula pode ser reduzida ou eliminada pela introdução de uma sequência complementar na sequência de nucleotídeos do gene que pode ser transcrita na célula e é capaz de hibridizar com o mRNA produzido na célula. Sob condições que permitem que a sequência de nucleotídeos de anti-senso hibridize com o mRNA, a quantidade de proteína traduzida é deste modo

reduzida ou eliminada.

[0176] A presente invenção adicionalmente se refere a uma célula mutante de uma célula precursora que compreende uma disrupção ou deleção de uma sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo ou uma sua sequência de controle, que resulta na célula mutante produzindo menos do polipeptídeo ou no polipeptídeo comparado à célula precursora.

[0177] As células mutantes deficientes em polipeptídeo assim produzidas são particularmente úteis como células hospedeiras para a expressão de polipeptídeos nativos e/ou heterólogos. Portanto, a presente invenção adicionalmente se refere aos métodos de produzir um polipeptídeo nativo ou heterólogo compreendendo: (a) cultivar a célula mutante sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo. O termo "polipeptídeos heterólogos" é aqui definido como polipeptídeos que não são nativos à célula hospedeira, uma proteína nativa na qual modificações têm sido feitas para alterar a sequência nativa, ou uma proteína nativa cuja expressão está quantitativamente alterada como um resultado de uma manipulação da célula hospedeira por técnicas de DNA recombinante.

[0178] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de produzir um produto de proteína essencialmente livre de atividade de acetil-xilano-esterase por fermentação de uma célula que produz ambos um polipeptídeo da presente invenção bem como o produto de proteína de interesse pela adição de uma quantidade eficaz de um agente capaz de inibir a atividade de acetil-xilano-esterase no caldo de fermentação antes, durante, ou após a fermentação ter sido completada, recuperar o produto de interesse do caldo de fermentação, e opcionalmente submeter o produto recuperado à purificação adicional.

[0179] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de produzir um produto de proteína essencialmente livre de

atividade de acetil-xilano-esterase pelo cultivo da célula sob condições que permitem a expressão do produto, submeter o caldo de cultura resultante a um tratamento de temperatura e de pH combinados de modo a reduzir substancialmente a atividade de acetil-xilano-esterase, e recuperar o produto do caldo de cultura. Alternativamente, o tratamento de temperatura e pH combinados pode ser realizado em uma preparação de enzima recuperada do caldo de cultura. O tratamento de temperatura e pH combinados pode ser opcionalmente usado em combinação com um tratamento com um inibidor de acetil-xilano-esterase.

[0180] De acordo com este aspecto da invenção, é possível remover pelo menos 60%, preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 95%, e muito mais preferivelmente pelo menos 99% da atividade de acetil-xilano-esterase. Remoção completa da atividade de acetil-xilano-esterase pode ser obtida pelo uso deste método.

[0181] O tratamento de temperatura e pH combinados é preferivelmente conduzido em pH dentro da faixa de 2-4 ou 9-11 e uma temperatura dentro da faixa de pelo menos 60-70°C por um período de tempo suficiente para alcançar o efeito desejado, onde tipicamente, 30 a 60 minutos é suficiente.

[0182] Os métodos usados para cultivo e purificação do produto de interesse podem ser realizados por métodos conhecidos na arte.

[0183] Os métodos da presente invenção para produzir um produto essencialmente livre de acetil-xilano-esterase é de interesse particular na produção de polipeptídeos eucarióticos, em particularmente de proteínas fúngicas tais como enzimas. A enzima pode ser selecionada de, e.g., uma enzima amilolítica, enzima lipolítica, enzima proteolítica, enzima celulolítica, óxido-redutase, ou enzima degradadora de parede celular de planta. Exemplos de tais enzimas incluem uma amino-peptidase, amilase, amiloglicosidase,

carboidrase, carbóxiptidase, catalase, celobioidrolase, celulase, quitinase, cutinase, ciclodextrina glicosiltransferase, desoxirribonuclease, endoglicanase, esterase, galactosidase, beta-galactosidase, glicoamilase, glicose oxidase, glicosidase, haloperoxidase, hemicelulase, invertase, isomerase, lacase, ligase, lipase, liase, manosidase, oxidase, enzima pectinolítica, peroxidase, fitase, fenol-oxidase, polifenol-oxidase, enzima proteolítica, ribonuclease, transferase, transglutaminase, ou xilanase. As células deficientes em acetil-xilano-esterase também podem ser usadas para expressar proteínas heterólogas de interesse farmacêutica tais com hormônios, fatores de crescimento, receptores, e semelhantes.

[0184] Será entendido que o termo "polipeptídeos eucarióticos" inclui não apenas polipeptídeos nativos, mas também aqueles polipeptídeos, e.g., enzimas, que têm sido modificados por substituições, deleções ou adições de aminoácido, ou outras tais modificações para intensificar atividade, termoestabilidade, tolerância a pH e semelhantes.

[0185] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um produto de proteína essencialmente livre de atividade de acetil-xilano-esterase que é produzido por um método da presente invenção.

Métodos de Inibir a Expressão de um Polipeptídeo Tendo Atividade de Acetil-xilano-esterase

[0186] A presente invenção também se refere aos métodos de inibir a expressão de um polipeptídeo da presente invenção em uma célula, compreendendo administrar à célula ou expressar na célula uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), sendo que a molécula de dsRNA compreende uma subsequência de um polinucleotídeo da presente invenção. Em um aspecto preferido, o dsRNA é cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais nucleotídeos dúplices em comprimento.

[0187] O dsRNA é preferivelmente um RNA interferente pequeno (siRNA) ou um microRNA (miRNA). Em um aspecto preferido, o

dsRNA é RNA interferente pequeno (siRNAs) para inibir a transcrição. Em outra modalidade preferida, o dsRNA é microRNA (miRNAs) para inibir a tradução.

[0188] A presente invenção também se refere a tais moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), compreendendo uma porção da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1 para inibir a expressão de um polipeptídeo em uma célula. Embora a presente invenção não seja limitada a qualquer mecanismo de ação particular, o dsRNA pode entrar em uma célula e causar a degradação de um RNA de fita única (ssRNA) de sequências similares ou idênticas, incluindo mRNAs endógenos. Quando uma célula é exposta ao dsRNA, mRNA o gene homólogo é seletivamente degradado por um processo chamado de interferência de RNA (RNAi).

[0189] Os dsRNAs da presente invenção podem ser usados em terapêuticos silenciadores de gene. Em um aspecto, a invenção fornece métodos para seletivamente degradar RNA usando os dsRNAs da presente invenção. O processo pode ser praticado *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Em um aspecto, as moléculas de dsRNA podem ser usados para gerar uma mutação de perda-de-função em uma célula, um órgão ou em um animal. Métodos de preparar e usar moléculas de dsRNA para seletivamente degradar RNA são bem conhecidos na arte, veja, por exemplo, Patente U.S. de N° 6.506.559; Patente U.S. de N° 6.511.824; Patente U.S. de N° 6.515.109; e Patente U.S. de N° 6.489.127.

Composições

[0190] A presente invenção também se refere às composições compreendendo um polipeptídeo da presente invenção. Preferivelmente, as composições estão enriquecidas com um tal polipeptídeo. O termo "enriquecida" indica que a atividade de acetil-xilano-esterase da composição tem sido aumentada, e.g., com um fator de enriquecimento de

pelo menos 1,1.

[0191] A composição pode compreender um polipeptídeo da presente invenção como o componente enzimático principal, *e.g.*, uma composição de monocomponente. Alternativamente, a composição pode compreender múltiplas atividades enzimáticas, tais como uma aminopeptidase, amilase, carboidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cutinase, ciclodextrina glicosiltransferase, desoxirribonuclease, esterase, alfa-galactosidase, beta-galactosidase, glicoamilase, alfa-glicosidase, beta-glicosidase, haloperoxidase, invertase, lacase, lipase, manosidase, oxidase, enzima pectinolítica, peptidoglutaminase, peroxidase, fitase, polifenol-oxidase, enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase, ou xilanase. A(s) enzima(s) adicional(ais) pode(m) ser produzira(s), por exemplo, por um microorganismo pertencendo ao gênero *Aspergillus*, preferivelmente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus fbetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, ou *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferivelmente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, ou *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferivelmente *Humicola insolens* ou *Humicola lanuginosa*; ou *Trichoderma*, preferivelmente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, ou *Trichoderma viride*.

[0192] As composições de polipeptídeo podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos na arte e podem estar na forma de uma composição líquida ou seca. Por exemplo, a composição de polipeptídeo pode estar na forma de um granulado ou um microgranulado. O

polipeptídeo a ser incluído na composição pode ser estabilizada de acordo com métodos conhecidos na arte.

[0193] Exemplos são dados abaixo de usos preferidos da composição de polipeptídeos da invenção. A dosagem da composição de polipeptídeo da invenção e outras condições sob as quais a composição é utilizada podem ser determinadas baseando-se nos métodos conhecidos na arte.

Usos

[0194] A presente invenção também é direcionada aos métodos para usar os polipeptídeos tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[0195] Os polipeptídeos da presente invenção podem ser utilizados para degradação ou modificação de paredes celulares de planta ou de qualquer material contendo xilano originário de paredes de células de planta. Exemplos de vários usos são descritos abaixo (veja, WO 2002/18561, para outros usos). A dosagem dos polipeptídeos da presente invenção e as outras condições sob as quais a preparação é usada podem ser determinada baseando-se nos métodos conhecidos na arte.

[0196] A degradação enzimática de xilano é facilitada pela remoção parcial ou total das cadeias laterais. Os polipeptídeos da presente invenção são preferivelmente usados conjuntamente com outras enzimas degradadoras de xilano tais como xilanases, acetil-xilano-esterases, arabinofuranosidases, xulosidases, feruloil-esterases, glicuronidases, e uma sua combinação, em processos nos quais xilano é para ser degradado. Por exemplo, grupos acetila podem ser removidos por acetil-xilano-esterases; grupos arabinose por alfa-arabinosidases; grupos feruloíla por feruloil-esterases, e grupos ácido glicurônico por alfa-glicuronidases. Os oligômeros liberados pelas xilanases, ou por uma combinação de xilanases e enzimas hidrolisadoras de cadeia lateral, podem ser adicionalmente degradados para xilose livre por beta-xilosidases. Um polipeptídeo da presente invenção é

preferivelmente um componente de uma composição compreendendo uma ou mais (várias) enzimas degradadoras de xilano, em particular xilanase. Nos vários usos descritos abaixo, um polipeptídeo da presente invenção é preferivelmente usado em combinação com uma ou mais (várias) enzimas degradadoras de xilano.

[0197] Consequentemente, a presente invenção também se refere aos métodos para degradar um material contendo xilano, compreendendo tratar o material contendo xilano com um tal polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Em um aspecto preferido, o material contendo xilano é adicionalmente tratado com uma enzima degradadora de xilano. A enzima degradadora de xilano pode ser selecionada do grupo consistindo de um xilanase, uma acetil-xilano esterase, uma feruloil-esterase, uma arabinofuranosidase, uma xilosidase, uma glicuronidase, e uma sua combinação.

[0198] O material de planta pode ser degradado com o propósito de melhorar os diferentes tipos de processamento, facilitar a purificação ou a extração de componentes diferentes de xilanos. O material de planta pode ser degradado com o propósito de melhorar os tipos diferentes de processamento, facilitar a purificação ou a extração de componentes diferentes dos xilanos, como purificação de beta-glicano ou oligômeros de beta-glicano de cereais, melhorar o valor alimentício, diminuir a capacidade de ligação de água, melhorar a degradabilidade em plantas aquáticas residuais, melhorar a conversão de, por exemplo, gramínea e milho para ensilagem, etc. Os polipeptídeos da presente invenção podem ser usados na hidrólise enzimática de vários materiais derivados de parede de célula de planta ou de materiais residuais, e.g., da produção de papel, ou resíduos agrícolas tais como palha de trigo, sabugos de milho, fibra de milho, plantas de grão inteiro, cascas de nozes, gramínea, cascas de vegetais, cascas de feijões, grãos consumidos, polpa de beterraba de açúcar, e semelhantes. Os

polipeptídeos também podem ser usados para modificar a viscosidade do material derivado de parede de célula de planta. Por exemplo, os polipeptídeos podem ser usados para reduzir a viscosidade do material contendo xilano, para promover o processamento de material viscoso contendo xilano, tal como em separação de trigo.

[0199] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados com atividade limitada das outras enzimas xilanolíticas para degradar xilanos para a produção de oligossacarídeos. Os oligossacarídeos podem ser usados como agentes encorpantes, como oligossacarídeos de arabinoxilano liberados de material de parede de célula de cereal, ou arabinoxilanos mais ou menos purificados de cereais.

[0200] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados em combinação com outras enzimas xilanolíticas para degradar xilanos em xilose e outros monossacarídeos (Patente U.S. de Nº 5.658.765). A xilose liberada pode ser convertida em outros compostos.

[0201] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser utilizados em degradação de biomassa lignocelulósica ou conversão de açúcares fermentáveis para a produção de, por exemplo, combustível, etanol potável, e/ou produtos de fermentação (e.g., ácidos, alcoóis, cetonas, gases, e semelhantes). Os polipeptídeos são preferivelmente usados em combinação com outras enzimas degradadoras de xilano e uma composição de celulase (endoglicanase(s), celobioidrolase(s), e beta-glicosidase(s)).

[0202] Os polipeptídeos da presente invenção podem ser usados juntos com outras enzimas como glicanases para melhorar a extração de óleo de material de planta rico em óleo, como óleo de milho de embriões de milho.

[0203] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados em cozimento para melhorar o desenvolvimento, a

elasticidade, e/ou a estabilidade de massa e/ou o volume, a estrutura miolo de pão e/ou as propriedades de anti-envelhecimento do produto cozido. Os polipeptídeos podem ser usados para a preparação de massa ou de produtos cozidos preparados de qualquer tipo de flor de farinha ou farinha fina (*e.g.*, baseada em trigo, centeio, cevada, aveia, ou milho). Os produtos cozidos produzidos com um polipeptídeo da presente invenção incluem pão, pães levedados, baguetes, e semelhantes. Para propósitos de cozimento um polipeptídeo da presente invenção pode ser usado como a única ou principal atividade enzimática, ou pode ser usado em combinação com outras enzimas tais como uma xilanase, uma lipase, uma amilase, uma oxidase (*e.g.*, glicose oxidase, peroxidase), a lacase e/ou uma protease.

[0204] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados para modificação de ração animal e podem exercer seu efeito quer *in vitro* (por modificação dos componentes da ração) quer *in vivo*. Os polipeptídeos podem ser adicionados nas composições de ração animal contendo quantidades altas de arabinosilanos e glicuronosilanos, *e.g.*, ração contendo cereais tais como cevada, trigo, centeio, aveia, ou milho. Quando adicionado na ração o polipeptídeo melhorará a degradação *in vivo* do material da parede de célula de planta parcialmente devido a uma redução da viscosidade intestinal (Bedford *et al.*, 1993, "Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition", pp. 73-77), por meio disto é alcançada a utilização melhorada dos nutrientes de planta pelo animal. Deste modo, a taxa de crescimento e/ou a taxa de conversão da ração (*i.e.*, o peso de ração ingerida relativo ao ganho de peso) do animal é melhorada.

[0205] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados na indústria de polpa e papel, *inter alia* em processos de alvejamento para intensificar a alvura de polpas alvejadas fazendo com que a quantidade de cloro usada nos estágios de alvejamento seja reduzida, e para aumentar a taxa de drenagem de água (*freeness*) de polpas no processo de

papel reciclado (Eriksson, 1990, *Wood Science and Technology* 24: 79-101; Paice *et al.*, 1988, *Biotechnol. and Bioeng.* 32: 235-239, e Pommier *et al.*, 1989, *Tappi Journal* 187-191). Ademais, os polipeptídeos podem ser usados para tratamento de polpa lignocelulósica de modo a melhorar a sua capacidade de alveijamento. O tratamento de polpa lignocelulósica pode ser realizado, por exemplo, como descrito em Patente U.S. de Nº 5.658.765, WO 93/08275, WO 91/02839, e WO 92/03608.

[0206] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados em fabricação da bebida fermentada cerveja, em particular para melhorar a capacidade de filtração de mosto de cerveja contendo, por exemplo, malte de cevada e/ou malte de sorgo (WO 2002/24926). Os polipeptídeos podem ser usados na mesma maneira com pentosanases convencionalmente utilizadas para fabricação de bebida fermentada, e.g., como descrito por Vietor *et al.*, 1993, *J. Inst. Brew.* 99: 243-248; e EP 227159. Ademais, os polipeptídeos podem ser utilizados para o tratamento de grão consumido em fermentadores, *i.e.*, resíduos da produção de mosto de cerveja contendo cevada ou cevada maltada ou outros cereais, de modo a melhorar a utilização dos resíduos para, e.g., ração animal.

[0207] Os polipeptídeos da presente invenção podem ser usados para a separação de componentes de materiais de célula de planta, em particular de componentes de cereais tais como componentes do trigo. De interesse particular é a separação de trigo em glúten e amido, *i.e.*, componentes de interesse comercial considerável. O processo de separação pode ser realizado pelo uso de métodos conhecidos na arte, convenientemente um denominado processo de batedeira (ou processo de moagem úmida) realizado como um hidrociclone ou um processo de decantação. Em um processo de batedeira, o material inicial é uma dispersão diluída bombeável do material de planta tal como trigo a ser submetido à separação. Em um processo de separação de trigo a dispersão é feita normalmente de farinha de

trigo é água.

[0208] Os polipeptídeos da invenção também podem ser usados na preparação de suco de frutas ou de vegetais com o propósito de aumentar o rendimento.

[0209] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados como um componente de um sistema de limpeza enzimática para materiais têxteis.

[0210] Os polipeptídeos da presente invenção também podem ser usados em aplicações de detergente para lavagem de roupas em combinação com outras funcionalidades de enzima.

Peptídeo de Sinal

[0211] A presente invenção também se refere aos construtos de ácido nucleico compreendendo um gene codificador de uma proteína, sendo que o gene está operacionalmente ligado a uma sequência de nucleotídeos codificadora de um peptídeo de sinal compreendendo ou consistindo de aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 2, sendo que o gene é estranho à sequência de nucleotídeos.

[0212] Em um aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de nucleotídeos 1 a 57 de SEQ ID NO: 1.

[0213] A presente invenção também se refere aos vetores de expressão recombinantes e às células hospedeiras recombinantes compreendendo tais construtos de ácido nucleico.

[0214] A presente invenção também se refere aos métodos de produzir uma proteína compreendendo (a) cultivar uma tal célula hospedeira recombinante sob condições adequadas para a produção da proteína; e (b) recuperar a proteína.

[0215] A proteína pode ser nativa ou heteróloga à célula hospedeira. O termo "proteína" não significa aqui que se refere a um

comprimento específico do produto codificado e, portanto, inclui peptídeos, oligopeptídeos, e proteínas. O termo "proteína" também inclui dois ou mais polipeptídeos combinados para formarem o produto codificado. As proteínas também incluem polipeptídeos híbridos que compreendem uma combinação de sequências de polipeptídeo parciais ou completas obtidas de pelo menos duas proteínas diferentes sendo que uma ou mais (várias) podem ser heterólogas ou nativas à célula hospedeira. Proteínas adicionalmente incluem variações alélicas naturalmente ocorrentes e engenhas das proteínas mencionadas acima e proteínas híbridas.

[0216] Preferivelmente, a proteína é um hormônio ou sua variante, enzima, receptor ou sua porção, anticorpo ou sua porção, ou repórter. Em um aspecto mais preferido, a proteína é uma óxido-redutase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, ou ligase. Em um aspecto ainda mais preferido, a proteína é uma aminopeptidase, amilase, carboidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cutinase, ciclodextrina glicosiltransferase, desoxirribonuclease, esterase, alfa-galactosidase, beta-galactosidase, glicoamilase, alfa-glicosidase, beta-glicosidase, invertase, lacase, outra lipase, manosidase, mutanase, oxidase, enzima pectinolítica, peroxidase, fitase, polilenol-oxidase, enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase ou xilanase.

[0217] O gene pode ser obtido de qualquer fonte procariótica, eucariótica, ou outra fonte.

[0218] A presente invenção é adicionalmente descrita pelos seguintes exemplos que não devem ser entendidos como limitantes do escopo da invenção.

Exemplos

Materiais

[0219] Compostos químicos usados como tampões e substratos foram produtos comerciais de grau pelo menos reagente.

Cepas

[0220] *Humicola insolens* DSM 1800 foi usada como a fonte de um gene de Família CE1 codificador de um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase. Cepa MBin 120 de *Aspergillus niger* (WO 2004/090155) foi utilizada para a expressão do gene de *Humicola Insolens* codificador do polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

Meios

[0221] Placas de PDA foram compostas por litro de 39 g de ágar de dextrose de batata.

[0222] Meio YP foi composto por litro de 10 g de extrato de levedo e 20 g de peptona Bacto.

[0223] Placas COVE A uréia- acetamida+ foram compostas por litro de 20 mL de soluções de sais COVE A, 220 g de sorbitol, 10 g de glicose, 10 mL de acetamida 1 M, e 30 g de ágar Bacto; pH 5,2.

[0224] Solução de sais COVE A foi composta por litro de 26 g de KCl, 26 g de MgSO₄, 76 g de KH₂PO₄, e 50 mL de solução de elementos traço COVE A.

[0225] Solução de elementos traço COVE foi composta por litro de 0,04 g de Na₂B₄O₇-10H₂O, 0,4 g de CuSO₄.5H₂O, 1,2 g de FeSO₄.7H₂O, 0,7 g de MnSO₄H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₂-2H₂O, e 10 g de ZnSO₄.7H₂O.

[0226] Meio M410 foi composto por litro de 50 g de maltose, 50 g de glicose, 2 g de MgSO₄.7H₂O, 2 g de KH₂PO₄, 4 g de pó anidro de ácido cítrico, 8 g de extrato de levedo, 2 g de uréia, 0,5 g de solução de metais traço AMG, e 0,5 g de CaCl₂; pH 6,0.

[0227] Solução de metais traço AMG foi composta por litro de 14,3 g de ZnSO₄.7H₂O, 2,5 g de CuSO₄.5H₂O, 0,5 g de NiCl₂.6H₂O, 13,8 g de FeSO₄.7H₂O, 8,5 g de MnSO₄.7H₂O, e 3 g de ácido cítrico.

[0228] Meio LB foi composto por litro de triptona, 5 g de

extrato de levedo, e 5 g de NaCl.

Exemplo 1: Identificação de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens*

[0229] Fracionamento de Proteína de ULTRAFLO® L.

Uma alíquota de 2 mL de ULTRAFLO® L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) foi primeiro tampão-trocada em acetato de sódio 20 mM de pH 5 com cloreto de sódio 150 mM, usando uma Coluna de Dessalinização HIPREP™ 26/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). O material tampão-trocado resultante (18,5 mL) foi então concentrado para 3 mL usando ultrafiltração com uma coluna spin VIVASPIN® 20 com uma membrana de corte de peso molecular de 3.000 Dalton (Vivascience AG, Hannover, Alemanha). Uma alíquota de 2 mL do material tampão-trocado e concentrado ULTRAFLO® L foi então fracionada por cromatografia de exclusão de tamanho sobre uma coluna de exclusão de tamanho de grau prep HILOAD™ 26/60 SUPERDEX™ 200 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) por eluição isocrática com o mesmo tampão. Frações mostrando absorbância em UV a 280 nm foram combinadas em seus combinações separadas de tempos de eluição variados, variando de 20-40 mL de volume total cada. Frações combinadas foram concentradas para entre 1 mL e 5 mL usando ultrafiltração com uma coluna spin VIVASPIN® 20 com uma membrana de corte de peso molecular de 3.000 Da. Vinte µL de cada fração combinada concentrada foram separados em um gel CRITERION™ 8-16% Tris-HCl SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante. "PRECISION PLUS PROTEIN™ STANDARDS" (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) foram usados como marcadores de peso molecular. O gel foi corado com corante de proteína Azul Coomassie (G250) (BIO-SAFE™ Coomassie Stain, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), e as bandas visíveis foram excisadas com uma lâmina de barbear para análise de identificação de proteína.

[0230] **Digestão em gel de polipeptídeos para sequenciamento de peptídeo.** Um Robô de Manuseio de Líquido MULTIPROBE® II (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) foi usado para realizar as digestões em gel. Uma banda de gel de proteína de 30 kDa foi reduzida com 50 µL de ditioneitol (DTT) 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM de pH 8,0 por 30 minutos. Após a redução, o pedaço de gel foi alquilado com 50 µL de iodo-acetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 100 mM de pH 8,0 por 20 minutos. O pedaço de gel seco foi permitido inchar em 25 nL de uma solução de digestão de tripsina contendo 6 ng de tripsina de grau de sequenciamento (Promega, Madison, WI, USA) por µL de bicarbonato de amônio 50 mM de pH 8 por 30 minutos na temperatura ambiente, seguido por uma digestão de 8 horas a 40°C. Cada uma das etapas de reação descritas acima foi seguida por numerosas lavagens e pré-lavagens com as soluções apropriadas seguindo o protocolo padrão do fabricante. Cinquenta µL de acetonitrila foram usados para desidratar o pedaço de gel entre as reações e o pedaço de gel foi seco com ar entre as etapas. Peptídeos foram extraídos duas vezes com ácido fórmico 1% / acetonitrila 2% em água de grau HPLC por 30 minutos. Soluções de extração de peptídeo foram transferidas para uma placa do tipo PCR com bordas e com 96 cavidades (ABGene, Rochester, NY, USA) que haviam sido esfriadas para 10-15°C e cobertas com uma tampa de placa de 96 cavidades (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) para evitar evaporação. Placas foram posteriormente armazenadas a 4°C até que pudesse ser realizada análise por espectrometria de massa

[0231] **Identificação de Proteína.** Para o sequenciamento de peptídeo de novo por espectrometria de massa em tandem, um Q-TOFM/CRO™ (Waters Micromass MS Technologies, Milford, MA, USA), um espectrômetro de massa de tempo-de-vôo de quadrupolo ortogonal híbrido, foi usado para análise por LC/MS/MS. O Q-TOF MICRO™ é

totalmente controlado por microprocessador usando o programa de computador MASSLYNX™ versão 4.1 (Waters Micromass MS Technologies, Milford, MA, USA). O Q-TOF *MICRO*™ estava equipado com um sistema de HPLC de nanofluxo e capilar ULTIMATE™, que estava acoplado com um micro-auto-amostrador FAMOS™ e um dispositivo comutador de coluna SWITCHOS™ II (LCPackings/Dionex, Sunnyvale, CA, USA) para concentrar e dessalinizar as amostras. Amostras foram carregadas em uma coluna guarda (300 µm de ID X 5 cm, PEPMAP™ C18) equipada com um circuito de injeção e lavada com ácido fórmico 0,1% em água a 40 µl por minuto por 2 minutos usando uma bomba Switchos II. Peptídeos foram separados em uma coluna capilar fusionada de nanofluxo de 75 µm de ID x 15 cm, C18, 3 µm, 10,0 nm PEPMAP™ (LC Packings, San Francisco, CA, USA) em uma vazão de fluxo de 175 µl/minuto de um fluxo de divisão de 175 µL/minuto usando um calibrador IMAN-75 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Uma gradiente de eluição em etapas de acetonitrila 5% a 80% em ácido fórmico 0,1% foi aplicado durante um intervalo de 45 minutos. O eluente da coluna foi monitorado a 215 nm e introduzido no Q-TOF *MICRO*™ através de uma fonte de íons de "electrospray" equipada com a interface de "nanospray".

[0232] Dados foram adquiridos no modo de escaneamento de inspeção de uma faixa de massa de m/z 400 a 1990 com critérios de comutação para MS a MS/MS para incluir uma intensidade de íons de maior do que 10,0 contagens por segundo e estados de carga de +2, +3, e +4. Espectros de análise de até 4 espécies de co-eluição com um tempo de escaneamento de 1,9 segundos e tempo de inter-escaneamento de 0,1 segundo puderam ser obtidos. Uma voltagem cônica de 45 volts foi tipicamente usada e a energia de colisão foi programada para ser variada de acordo com a massa e o estado de carga do peptídeo eluindo e dentro da faixa de 10-60 volts. The Os espectros adquiridos foram combinados, uniformizados, e centrados em

um modo automático e uma lista de picos foi gerada. A lista de picos foi pesquisada contra bancos de dados selecionados usando o programa de computador PROTEINLYNX™ Global Server 2.2.05 (Waters Micromass MS Technologies, Milford, MA, USA) e PEAKS Studio versão 4.5 (SP1) (Bioinformatic Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canadá). Resultados das pesquisas em PROTEINLYNX™ e PEAKS Studio foram calculados e proteínas não identificadas foram analisadas depois pela avaliação dos espectros de MS/MS de cada íon de interesse e a sequência de novo conforme determinado para identificar a série de íons y e b e combinação de diferenças de massa com o aminoácido apropriado.

[0233] Uma sequência de peptídeo foi obtida de um íon de peptídeo de carga múltipla recuperado da banda de gel de polipeptídeo de 30 kDa digerido em gel. Um íon de peptídeo tríptico de carga dupla de sequência de 514,772 m/z determinado foi Asn-Ser-Tyr-Pro-Gly-Tyr-[Asp ou Asn]-Gly-Arg (SEQ ID NO: 4).

Exemplo 2: Extração de DNA genômico de *Humicola insolens* DSM1800

[0234] *Humicola insolens* DSM 1800 foi crescido em placas PDA a 45°C até confluência. Três quadrados de 4 mm² foram cortados das placas de PDA, inoculados em 25 mL de meio YP contendo 2% de glicose em um frasco de agitação de 125 mL com defletor, e incubados a 41°C com agitação a 200 rpm por 2 dias. Micélios foram colhidos por filtração usando MIRACLOTH® (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), lavados duas vezes em água deionizada, e congelados sob nitrogênio líquido. Micélios congelados foram moídos, por almofariz e pilão, para um pó fino, e o DNA total foi isolado usando um DNEASY® Plant Maxi Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

Exemplo 3: Isolamento de um fragmento parcial de um gene de acetil-xilano-esterase gene de *Humicola insolens* DSM 1800

[0235] Usando o "Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer Program" (CODEHOP; Rose *et al.*, 1998, *Nucleic Acids Research* 26: 1628-1635), iniciadores degenerados, mostrados abaixo, foram planejados para o peptídeo identificado descrito em Exemplo 1.

[0236] Iniciador (Primer) HiFAE-degF

5'-WSNYTNCARCARGTNTGGAAATGGGGNGCNAAY-3'

(SEQ ID NO: 5)

[0237] Tradução de proteína para iniciador (primer) degenerado HiFAE-degF:

XXQQVWNWGA (SEQ ID NO: 6)

[0238] Iniciador (Primer) HiFAE-degR:

5'-GGCGGCGGCCGTCRTANCCNGGRTA-3' (SEQ ID NO: 7)

[0239] Tradução de proteína para iniciador (primer) degenerado HiFAE-degR:

YPGYDGRR

[0240] Para obter o fragmento de DNA inicial do gene de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens*, a reação de amplificação (25 µl) foi composta de 117 ng de DNA genômico de *Humicola insolens* DSM 1800 como modelo, 0,4 mM de cada um de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 50 pmol de cada iniciador (primer) HiFAE-degR e iniciador (primer) HiFAE-degF, "1X ADVANTAGE® GC-Melt LA Buffer" (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), e 1,25 unidades de "ADVANTAGE® GC Genomic Polymerase Mix". A amplificação foi realizada usando um "EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333" (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA) programado para pré-desnaturação a 94°C por 1 minuto; 30 ciclos cada em uma temperatura de desnaturação de 94°C por 30 segundos; temperatura de anelamento de 60°C por 30 segundos; alongamento a 72°C por 90 segundos; e alongamento final a 72°C por 5 minutos.

[0241] Os produtos de reação foram isolados por

eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE (10,8 g de base Tris, 5,5 g de ácido bórico e 4 mL de EDTA 0,5 M de pH 8,0 por litro).

[0242] Uma banda de produto de PCR de aproximadamente 1,1 kb foi excisada do gel, purificada usando um "QIAQUICK® Gel Extraction Kit" (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e sequenciada. Baseado no sequenciamento foi verificado que o iniciador (primer) HiFAE-degF não se ligou durante a amplificação, enquanto que o iniciador (primer) HiFAE-degR se ligou em ambas as extremidades. Foi obtida uma sequência parcial que codificou um fragmento de peptídeo que foi homólogo a uma acetil-xilano-esterase putativa de *Neosartorya fischeri* (Uniprot:A1 DBP9).

Exemplo 4: Identificação de um gene de acetil-xilano-esterase de comprimento total de *Humicola insolens*

[0243] Um gene de acetil-xilano-esterase de comprimento total da Família CE1 foi identificado de *Humicola insolens* DSM 1800 usando um "GENOMEWALKER™ Universal Kit" (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, DNA genômico total de *Humicola insolens* DSM 1800 foi digerido separadamente com quatro enzimas de restrição diferentes (*Dra* I, *Eco* RV, *Pvu* II, e *Stu* I) que deixam extremidades cegas. Cada batelada de DNA genômico digerido foi então ligada separadamente no "GENOMEWALKER™ Adaptor" (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) para formar quatro bibliotecas. Estas quatro bibliotecas foram então utilizadas como modelos em reações PCR usando dois iniciadores (primers) gene-específicos mostrados abaixo, um para uma amplificação por PCR primária e um para uma amplificação por PCR secundária a jusante do fragmento através da extremidade 3' codificadora da terminação-C da acetil-xilano-esterase. Baseado em homologia de sequência com as outras acetil-xilano-esterases, pareceu que a 5' extremidade

codificadora da terminação-N da acetil-xilano-esterase estava contida dentro do fragmento inicial descrito em Exemplo 3. Os seguintes iniciadores (primers) foram planejados baseando-se na sequência parcial de gene de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* obtida como descrito em Exemplo 3:

[0244] Iniciador (Primer) Hins_AXE_GSP1_F1 (primário):
5'-CTACACGGGCACTGTTGCTGGCTGGAA-3' (SEQ ID NO: 8)

[0245] Iniciador (Primer) Hins_AXE_GSP2_F3
(secundário):

5'-ACACTGGGCCAGGACGGCGCTCGATAT-3' (SEQ ID NO: 9)

[0246] As amplificações primárias foram compostas de 1 µL (aproximadamente 6 ng) de cada biblioteca como modelo, 0,4 mM de cada um de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 10 pmol de iniciador Adaptor Primer 1 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), 50 pmol de Iniciador (primer) Hins_AXE_GSP1_F1, 1X ADVANTAGE® GC-Melt LA Buffer (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), e 1,25 unidades de "ADVANTAGE® GC Genomic Polymerase Mix" em um volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas usando um "EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333" programado para pré-desnaturar a 95°C por 1 minuto; 5 ciclos cada em uma temperatura de desnaturação de a 95°C por 25 segundos; anelamento e alongamento a 72°C por 5 minutos; 7 ciclos cada em uma temperatura de desnaturação de 95°C por 25 segundos; anelamento e alongamento a 72°C por 5 minutos; 32 ciclos cada em uma temperatura de desnaturação de 95°C por 25 segundos; anelamento e alongamento a 67°C por 5 minutos; e um alongamento final a 67°C por 7 minutos.

[0247] As amplificações secundárias foram compostas de 1 µL de cada produto de PCR primária como modelo, 0,4 mM de cada um de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 10 pmol de iniciador Adaptor Primer 2

(Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), 50 pmol de iniciador (primer) Hins_AXE_GSP2_F3, "1X ADVANTAGE® GC-Melt LA Buffer", e 1,25 unidades de "ADVANTAGE® GC Genomic Polymerase Mix" em um volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas usando um "EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333" programado para pré-desnaturar a 95°C por 1 minuto; 5 ciclos cada em uma temperatura de desnaturação de 95°C por 25 segundos; anelamento e alongamento a 72°C por 5 minutos; 20 ciclos cada em uma temperatura de desnaturação de 95°C por 25 segundos; anelamento e alongamento a 67°C por 5 minutos; e alongamento final a 67°C por 7 minutos.

[0248] Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE. Da biblioteca *Pvu* II, produtos de 1 kb a 1,8 kb foram excisados do gel, purificados usando um "QIAQUICK® Gel Extraction Kit" (QIAGEN, Valencia, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e sequenciados.

[0249] Sequenciamento de DNA dos fragmentos de PCR foi realizado com um "Perkin-Elmer Applied Biosystems Model 377 XL Automated DNA Sequencer" usando a química de corante-terminador (Giesecke *et al.*, 1992, *supra*) e a estratégia "primer walking". Iniciador Adaptor Primer 2 e iniciador (primer) Hins_AXE_GSP2_F3 foram usados para sequenciamento.

[0250] Dados de sequência de nucleotídeos foram investigados para qualidade e todas as sequências foram comparadas umas com as outras com o auxílio do programa de computador = PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA). Os resultados da sequência de fragmento de PCR foram comparados e alinhados com a sequência parcial de gene de acetil-xilano-esterase gene de *Humicola insolens* descrita em Exemplo 3. Um modelo de gene foi construído baseado nos fragmentos de gene neste Exemplo e em Exemplo 3 permitindo a determinação das

extremidades 5' e 3' e do gene com outras acetil-xilano-esterases homólogas.

Exemplo 5: Clonagem do gene de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* e construção de um vetor de expressão de *Aspergillus niger*

[0251] Os dois iniciadores (primers) de oligonucleotídeo sintéticos mostrados abaixo foram planejados para amplificação por PCR do gene de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* a partir do DNA genômico preparado em Exemplo 2. Um "InFusion Cloning Kit" (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) foi usado para clonar o fragmento diretamente no vetor de expressão pBM120a (WO 2006/078256).

[0252] HinsAXEBDinfnterm:

5'-ACACAACTGGCCATGAAGGTCCCGACTCTCATCTCG-3'

(SEQ ID NO: 10)

[0253] HinsAXEBDinfCtermendPacI:

5'-CAGTCACCTCTAGTTATTACAGGCACTGAGAGTACC-3'

(SEQ ID NO: 11)

[0254] As letras em negrito representam a sequência codificadora. A sequência restante é homóloga aos sítios de inserção de pBM120a.

[0255] Cinquenta picomols de cada um dos iniciadores (primers) acima foram usados em uma reação PCR composta de 80 ng de DNA genômico de *Humicola insolens*, "1X ADVANTAGE® GC-Melt LA Buffer", 0,4 mM de cada um de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, e 1,25 unidades de "ADVANTAGE® GC Genomic Polymerase Mix" em um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada usando um "EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333" programado para 1 ciclo a 94°C por 1 minuto; 30 ciclos cada um a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, e 72°C por 90 segundos; e um alongamento final a 70°C por 5 minutos. O bloco de aquecimento então foi para um ciclo de embebedimento a

4°C.

[0256] Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE onde uma banda de produto de aproximadamente 1,2-1,3 kb foi excisada do gel, e purificado usando um "QIAQUICK® Gel Extraction Kit" de acordo com as instruções do fabricante.

[0257] Plasmídeo pBM120a foi digerido com *Nco* I e *Pac* I, isolado por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE, e purificado usando um "QIAQUICK® Gel Extraction Kit" de acordo com as instruções do fabricante.

[0258] O fragmento de gene e o vetor digerido foram ligados juntos usando um "InFusion Cloning Kit" resultando em pMMarB (Figure 2) no qual a transcrição do gene de acetil-xilano-esterase esteve sob o controle de um híbrido de promotores dos genes para alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger* e triose fosfato isomerase de *Aspergillus oryzae* (promotor NA2-tpi). A reação de ligação (20 µL) foi composta de "1X InFusion Buffer" (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA), 1X BSA (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA), 1 µL de enzima InFusion (diluída 1:10) (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA), 106 ng de pBM120a digerido com *Nco* I e *Pac* I, e 208 ng do produto de PCR de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens*. A reação foi incubada na temperatura ambiente por 30 minutos. Dois µL da reação foram usados para transformar células "*E. coli* XL10 SOLOPACK® Gold Supercompetent" (Stratagene, La Jolla, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Um transformante de *E. coli* contendo pMMar6 foi detectado por digestão por restrição e plasmídeo DNA foi preparado usando um BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). O inserto de gene de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* em pMMar6 foi confirmado por sequenciamento de DNA com um "Perkin-Elmer Applied Biosystems Model 377 XL Automated DNA Sequencer" usando química de

corante-terminador (Giesecke *et al.*, 1992, *supra*) e estratégia "primer walking". Iniciador (Primer) 996271 Na2tpi promoter fwd e iniciador (primer) 996270 AMG rev, mostrados abaixo, foram usados para sequenciamento.

[0259] 996271 Na2tpi promoter fwd:

5'-ACTCAATTTACCTCTATCCACACTT-3' (SEQ. ID NO: 12)

[0260] 996270 AMG rev:

5'-CTATAGCGAAATGGATTGATTGTCT-3' (SEQ. ID NO: 13)

[0261] Um clone contendo pMMar6 foi inoculado em 2 X 50 mL de meio LB contendo 100 µg de ampicilina por mL e crescido durante a noite em frascos de vidro de 250 mL a 37°C e agitação a 200 rpm. Plasmídeo pMMar6 foi isolado do caldo usando um "QIAGEN® Midi Kit" de acordo com as instruções do fabricante. Plasmídeo pMMar6 foi digerido com *Pme* I, isolado por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE, e o fragmento contendo o gene de acetil-xilano-esterase foi amplificado usando um "QIAQUICK® Gel Extraction Kit" de acordo com as instruções do fabricante em preparação para transformar protoplastos *Aspergillus niger* MBin120. O mesmo fragmento de PCR de aproximadamente 1,2-1,3 kb foi clonado em vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) usando um "TOPO® TA CLONING Kit" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para gerar pHinsAXE2 (Figure 3). O inserto de gene de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* em pHinsAXE2 foi confirmado por sequenciamento de DNA. *E. coli* pHinsAXE2 foi depositada em "Agricultural Research Service Patent Culture Collection", "Northern Regional Research Center", Peoria, IL, USA, aos 20 de Novembro de 2007.

Exemplo 6: Caracterização da sequência genômica de *Humicola insolens* codificadora de acetil-xilano-esterase de Família CE1

[0262] Dados de sequência de nucleotídeos (Exemplo 5) foram examinados para qualidade e todas as sequências foram comparadas

umas com as outras com assistência de programa de computador PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).

[0263] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 2) são mostradas em Figuras 1A e 1B. O fragmento genômico codifica um polipeptídeo de 377 aminoácidos, interrompido por 2 íntrons preditos de 73 pb e 62 pb. O teor % de G+C da sequência codificadora de comprimento total e da sequência codificadora madura são de 60,4% e 60,5%, respectivamente. Com o uso do programa de computador SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), um peptídeo de sinal de 19 resíduos foi predito. A proteína madura predita contém 358 aminoácidos com uma massa molecular de 38,5 kDa. Um domínio de esterase poli(hidróxi-butirato) despolimerase ocorre em aminoácidos 43 a 257 e um domínio predito ligante de celulose em aminoácidos 341 a 377. Baseado na sequência de aminoácidos deduzida, a acetil-xilano-esterase parece cair dentro da Família CE1 de carboidrato esterase de acordo com Coutinho e Henrissat, 1999, *supra*.

[0264] Um alinhamento global pareado comparativo de sequências de aminoácidos foi determinado usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) como implementado no programa Needle de EMBOSS com penalidade de lacuna de 10, penalidade de extensão lacuna de 0,5, e a matriz EBLOSUM62. O alinhamento mostrou que a sequência de aminoácidos deduzida do polipeptídeo maduro do gene de acetil-xilano-esterase da Família CE1 de *Humicola insolens* compartilhou 72,4% de identidade (excluindo lacunas) com a sequência de aminoácidos deduzida de uma acetil-xilano-esterase de *Chaetomium gracile* (número de acesso em GeneSeqP de AAB82124).

Exemplo 7: Transformação e expressão do gene de acetil-xilano-esterase da Família CE1 de *Humicola insolens* em *Aspergillus niger* MBin120

[0265] O gene de acetil-xilano-esterase da Família CE1 de *Humicola insolens* foi expressado em *Aspergillus niger* MBin120. Protoplastos de *Aspergillus niger* MBin120 foram preparados de acordo com o método de Christensen *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422. Cinco µg de pMMar6 digerido com *Pme* I foram usados para transformar *Aspergillus niger* MBin120.

[0266] A transformação de *Aspergillus niger* MBin120 com o pMMar6 digerido por *Pme* I deu aproximadamente 45 transformantes. Vinte e cinco transformantes foram isolados em placas individuais COVE A uréia-acetamida+. Duas camadas de ágar de 3 mm quadrados foram cortadas das placa confluentes COVE A uréia- acetamida+ dos 25 transformantes e inoculadas separadamente em 25 mL de meio M410 em frascos de agitação de plástico de 125 mL e incubados a 34°C com agitação a 250 rpm. Após incubação de 5 dias, 6 µL de sobrenadante de cada cultura foram analisados em um gel "CRITERION™ 8-16% Tris-HCl SDS-PAGE" com uma "CRITERION® Cell" (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O gel resultante foi corado com corante "BIO-SAFE™ Coomassie".

[0267] Perfis de SDS-PAGE das culturas mostraram que aproximadamente metade dos transformantes tinha uma banda maior de aproximadamente 50 kDa. Um transformante chamado de *Aspergillus niger* MMar204 foi escolhido para expressão do polipeptídeo de *Humicola insolens* tendo atividade de acetil-xilano-esterase em *Aspergillus niger*.

Exemplo 8: Fermentação de *Aspergillus niger* MMar204

[0268] Meio em frasco de agitação foi composto por litro de 70 g de sacarose e 100 g de concentrado de soja. Solução de metais traço foi composta por litro de 13,8 g de FeSO₄.7H₂O, 14,3g de ZnSO₄.7H₂O, 11,6g de MnSO₄.H₂O, 2,5 g de CuSO₄.5H₂O, 0,5g de NiCl₂.6H₂O e 3,3 g de ácido cítrico mono-hidratado.

[0269] Cem mL do meio do frasco de agitação foram adicionados em cada um de quatro frascos de agitação de 500 mL. Os frascos de agitação foram cada um inoculados com 200 µL de um estoque em glicerol de esporos de *Aspergillus niger* MMar204 e incubados a 30°C em um agitador orbital a 220 rpm por 72 horas. Cinquenta mL do caldo do frasco de agitação de cada um dos quatro frascos de agitação foram usados para inocular um vaso de fermentação de 3 litros .

[0270] O meio de caldo de fermentação foi composto por litro de 250 g de glicose, 5 g de (NH₄)₂SO₄, 2,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de CaCl₂.2H₂O, 2 g de MgSO₄.7H₂O, 3 g de K₂SO₄, 1 g de ácido cítrico, 1 mL de antiespumante e 0,75 mL de solução de metais traço. A solução de metais traço foi composta por litro de 13,8 g de FeSO₄.7H₂O, 14,3 g de ZnSO₄.7H₂O, 11,6 g de MnSO₄.H₂O, 2,5 g de CuSO₄.5H₂O, 0,5 g de NiCl₂.6H₂O, e 3,3 g de ácido cítrico mono-hidratado. Meio de alimentação de fermentação foi composto por quilograma de 406 g de maltose, 0,5 g de ácido cítrico mono-hidratado, e 1 mL de antiespumante.

[0271] Um total de 2 litros de meio de batelada de fermentação foi adicionado em um fermentador encamisado de vidro de dois litros da Applikon Biotechnology (Applikon Biotechnology, Schiedam, Países-Baixos). O meio de alimentação de fermentação foi dosado em uma taxa de 0 a 4 g/L/h por um período de 185 horas. O vaso de fermentação foi mantido em uma temperatura de 34°C e o pH foi controlado usando um sistema de controle Applikon 1030 (Applikon Biotechnology, Schiedam, Países-Baixos) para um ponto de ajuste de 5,1 +/- 0,1. Ar foi adicionado no vaso em uma taxa de 1 vvm e o caldo foi agitado por hélice Rushton girando a 1.100 rpm. No término da fermentação, todo o caldo foi colhido do vaso e centrifugado a 3.000 x g para remover a biomassa. O sobrenadante foi esterilmente filtrado e armazenado a de 5°C a 10°C.

Exemplo 9: Purificação de polipeptídeo tendo atividade de

acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens*

[0272] Sobrenadante do caldo de fermentação descrito em Exemplo 8 foi primeiro tampão-trocado em MES 20 mM de pH 6 e concentrado usando um sistema de filtração de fluxo tangencial Pall Filtron consistindo de uma Ultrapump II, um ULTRARESERVOIR™ 5L, e uma membrana de filtração de fluxo tangencial ULTRASETTE™ 10K Omega com um corte de peso molecular de 10.000 Da (Pall Corporation, East Mills, NY, USA). O material tampão-trocado resultante (150 mL) foi então purificado sobre 120 mL de resina de SP SEPHAROSE™ Big Beads (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrada com MES 20 mM de pH 6, e então eluída com um gradiente linear de cloreto de sódio 0-1 M. Frações foram colhidas e monitoradas a 280 nm. Uma alíquota de 2,5 µL das frações tendo absorvância em UV a 280 nm foi analisada em um gel "CRITERION™ 8-16% Tris-HCl SDS-PAGE" de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante. "PRECISION PLUS PROTEIN™ STANDARDS" foram usados como marcadores de peso molecular. O gel foi corado com "BIO-SAFE™ Coomassie". Frações mostrando uma banda a 55 kDa, correspondendo à acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens*, foram combinadas para dar a acetil-xilano-esterase purificada (130 mL) de pureza maior do que 90%.

[0273] A acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* foi ensaiada para atividade de enzima usando acetato de *p*-nitro-fenila como substrato (Sigma-Aldrich Chemical co., Inc., St Louis, MO, USA). Ensaios de atividade foram realizados em uma placa de microtítulo de 96 cavidades COSTAR® (Corning Inc., Corning, NY, USA). Uma solução de acetato de *p*-nitro-fenila 100 mM foi inicialmente preparada em DMSO, e então diluída para uma solução 1 mM em acetato de sódio 50 mM de pH 5,0 com 0,01% de TWEEN® 20. A reação de enzima foi então iniciada pela adição de uma alíquota da acetil-xilano-esterase purificada de *Humicola insolens* na suspensão de substrato acetato de *p*-nitro-fenila 1 mM, resultando em uma

concentração final de substrato acetato de *p*-nitro-fenila de 0,5 mM. A reação foi permitida prosseguir por 10 na temperatura ambiente (25°C), em cujo tempo Tris-HCl 1 M de pH 8,0 foi adicionado, e a quantidade de ânion *p*-nitro-fenolato liberada foi determinada por um aumento em absorbância a 405 nm usando um leitor de placa "SPECTRAMAX™ 340 PC" (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de proteína purificada foi determinada usando um "Microplate BCA™ Protein Assay Kit" (Pierce, Rockford, IL, USA). Uma unidade de atividade de acetil-xilano-esterase é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ânion *p*-nitro-fenolato por minuto em pH 5, 25°C.

[0274] A acetil-xilano-esterase *Humicola insolens* foi determinada em ter uma atividade de 15,4 unidades por mg de enzima.

Exemplo 10: Termoestabilidade de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens*

[0275] A termoestabilidade da acetil-xilano-esterase purificada de *Humicola insolens* (Exemplo 9) foi determinada por calorimetria diferencial de varredura (DSC) usando um A VP-DSC (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante em acetato de sódio 50 mM de pH 5,0.

[0276] A temperatura de desnaturação, T_d , foi considerada como o topo do pico de desnaturação (pico endotérmico maior) em um termograma (C_p versus T) obtido após o aquecimento da solução de enzima em uma taxa de aquecimento programada de 90°C por hora iniciando a 20°C. A T_d para a acetil-xilano-esterase sob estas condições foi 71(+/-1)°C.

Exemplo 11: Efeito de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* sobre a hidrólise de fibra de milho pré-tratada

[0277] O efeito de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* sobre a hidrólise de fibra de milho pré-tratada foi avaliado. Fibra de milho é uma fração da moagem úmida de grãos de milho. Fibra de milho é a

casca da semente e o endosperma residual deixados após o amido ter sido removido e adicionalmente processado. Fibra de milho foi pré-tratada em autoclave 140°C por 150 minutos. A quantidade de arabinose, glicose e xilose no substrato determinada foi de 175, 317, e 261 g por kg de matéria seca usando os seguintes métodos.

[0278] Arabinose e xilose foram determinadas por hidrólise com carboidrase usando ácido clorídrico diluído. A fibra de milho pré-tratada foi transferida para frascos cônicos de 125 mL e diluída para conter aproximadamente 10% de matéria seca. A amostra de fibra de milho foi preaquecida a 100°C em um banho de óleo. Hidrólise foi iniciada pela adição de 5 mL de ácido clorídrico 2 M por 2 horas 100°C. Após a incubação os frascos foram esfriados sobre gelo e neutralizados com hidróxido de sódio 4 M. Amostras foram filtradas com um filtro de seringa de 0,2 micrômetro "MINI IS ART®" (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha) e analisadas para arabinose e xilose em um "DIONEX BIOLC® System" (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Glicose foi determinada por sujeição da amostra pré-tratada da fibra de milho a uma hidrólise com ácido sulfúrico de duas etapas. Três mL de ácido sulfúrico 72% foram adicionados em aproximadamente 300 mg de fibra de milho seca em tubos de pressão (Ace Glass, Inc., Vineland, NJ, USA). As amostras foram misturadas e deixadas em um banho de água a 30°C por 60 minutos. As amostras foram agitadas a cada 5 a 10 minutos. Após 60 minutos as amostras foram removidas e 84 mL de água deionizada foram removidos. As amostras foram deixadas em um autoclave e aquecidas por 1 hora a 121°C. Após esfriamento as amostras foram filtradas para remover os sólidos restantes e foram neutralizadas pela adição de carbonato de cálcio.

[0279] A concentração de glicose foi determinada com um "DIONEX® BIOLC® System" de acordo com o seguinte método. Amostras (10 µL) foram carregadas em um "DIONEX BIOLC® System" equipado com

uma coluna analítica "DIONEX® CARBOPAC™ PA1" (4 mm x 250 mm) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) combinada com uma coluna guarda "CARBOPAC™ PA1" (4 mm x 50 mm) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Os monossacarídeos foram separados isocraticamente com hidróxido de potássio 10 mM em uma vazão de fluxo de 1 mL por minuto e detectados por um detector eletroquímico pulsado no modo de detecção amperométrica pulsada. O potencial do eletrodo foi programado para +0,1 volt (t=0-0,4 segundo) a -2,0 volt (t=0,41-0,42 segundo) a 0,6 volt (t=0,43 segundo) e finalmente -0,1 volt (t=0,44-0,50 segundo), enquanto o sinal resultante era integrado de t=0,2-0,4 segundo. Foi usada uma mistura de arabinose, galactose, glicose, e xilose (concentração de cada componente: 0,0050-0,075 g por litro) como um padrão.

[0280] A hidrólise da fibra de milho pré-tratada foi conduzida com uma proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* (caldo de *Trichoderma reesei* compreendendo polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus* GH61A tendo atividade celulolítica intensificada e fusão de beta-glucosidase de *Aspergillus oryzae*; PCT/US2008/065417) e uma beta-xilosidase de *Trichoderma reesei*. A beta-xilosidase de *Trichoderma reesei* foi obtida recombinantemente por expressão como descrito em Rasmussen *et al.*, 2006, *Biotechnology and Bioengineering* 94: 869-876 usando métodos de cultivo padrão para *Aspergillus oryzae*. A acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* foi obtida como descrito em Exemplo 9.

[0281] A hidrólise da fibra de milho pré-tratada foi realizada em tubos EPPENDORF® de 2 mL (Eppendorf AG, Alemanha) em uma temperatura de 50°C e um pH de 5,0 em ácido succínico 50 mM. As amostras foram incubadas em um "THERMOMIXER® Comfort" (Eppendorf AG, Alemanha) que submeteu cada amostra ao aquecimento e à misturação constantes. A quantidade de substrato usada foi de 2,5% p/p em um volume de amostra total de 2 mL. A acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* foi

adicionada em um carregamento de enzima de 1 mg de enzima por g de matéria seca sobre o topo do caldo de composição de proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* e a beta-xilosidase de *Trichoderma reesei*. A composição de proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* foi adicionada em um carregamento de 5 mg de enzima por g de matéria seca e a beta-xilosidase de *Trichoderma reesei* em um carregamento de 1 mg de enzima por g de matéria seca. A hidrólise foi terminada após 24 horas por aquecimento das amostras por 10 minutos a 100°C em um bloco de aquecimento (Techne Inc., Burlington NJ, USA).

[0282] Quantificação de ácido acético foi conduzida por cromatografia líquida de pressão alta usando duas colunas AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) acoplada em série com uma pré-coluna (Micro-Guard Cation H Refill Cartridges, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) com uma "WATERS® 515 Pump", "WATERS® MPSA Millipore", "WATERS® 717 Plus Autosampler", "WATERS® Column Heater Module" e "WATERS® 2410 R1 detector" (Waters Corporation, Milford, MA, USA). A cromatografia foi realizada a 60°C com um fluxo de 0,4 mL/minuto de ácido sulfúrico 0,005 M.

[0283] Conversão foi calculada pela determinação da quantidade de açúcares liberada do substrato como uma percentagem do que foi adicionado desde o início usando a fórmula abaixo. Testes-T foram conduzidos com uma distribuição bilateral e variância igual de dados de amostra. $\text{Conversão (\%)} = (\text{Quantidade de açúcar em hidrolisado} / \text{Quantidade de açúcar em substrato adicionado}) \times 100$.

[0284] Comparação da conversão da fibra de milho pré-tratada quando se adicionou a acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* em um carregamento de enzima de 1 mg de enzima por grama de matéria seca junto com 1 mg de enzima por g de matéria seca de beta-xilosidase de

Trichoderma reesei e 5 mg de enzima por g de matéria-seca de composição de proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* com apenas a adição de 1 mg de enzima por g de matéria seca de beta-xilosidase de *Trichoderma reesei* e 5 mg de enzima por g de matéria seca de composição celulolítica de *Trichoderma reesei* demonstrou um aumento significativo ($P \leq 0,0519$) em conversão relativa de 100,0 para 109,9 (Tabela 1).

Tabela 1

Amostras	Conversão total relativa	Desvio padrão	Teste-T
Composição de proteína celulolítica de <i>Trichoderma reesei</i> e beta-xilosidase de <i>Trichoderma reesei</i>	100,0	3,2	0,0519
Composição de proteína celulolítica de <i>Trichoderma reesei</i> , beta-xilosidase de <i>Trichoderma reesei</i> , e acetil-xilano-esterase de <i>Humicola insolens</i>	109,9	3,4	

[0285] A liberação de ácido acético do substrato aumentou significativamente ($P \leq 0,0004$) de 100,0 para 236,0 pela adição de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* na combinação de composição de proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* e a beta-xilosidase de *Trichoderma reesei* (Tabela 2).

Tabela2

Amostras	Liberação relativa de ácido acético	Desvio padrão	Teste-T
Composição de proteína celulolítica de <i>Trichoderma reesei</i> e beta-xilosidase de <i>Trichoderma reesei</i>	100,0	10,0	0,0004
Composição de proteína celulolítica de <i>Trichoderma reesei</i> , beta-xilosidase de <i>Trichoderma reesei</i> , e acetil-xilano-esterase de <i>Humicola insolens</i>	236,0	2,8	

Exemplo 12: Efeito de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* sobre a hidrólise de tetraacetato de D-xilose

[0286] O efeito de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* sobre a hidrólise de tetraacetato de D-xilose foi avaliado. A acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* foi obtida como descrito em Exemplo 9.

[0287] A hidrólise de tetraacetato de D-xilose (Benn Chemicals, Dielsdorf, Suíça) foi realizada em tubos EPPENDORF® de 1,5 mL em uma temperatura de 50°C e em um pH de 5,0 em ácido succínico 50

mM por 48 horas. As amostras foram incubadas em um "THERMOMIXER® Comfort" que submeteu cada amostra ao aquecimento e à mistura constantes. A quantidade de substrato usada foi de 1 mL em uma concentração de 1% p/p de tetraacetato de D-xilose. A amostra de controle (1 mL de substrato) foi comparada com a amostra de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* (1 mL de substrato + 7 µL de enzima). A acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* foi adicionada em um carregamento de enzima de 0,5 mg de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens*/g de sólidos secos. A hidrólise foi terminada após 48 horas por aquecimento das amostras por 10 minutos a 100°C em um bloco de aquecimento.

[0288] A quantidade de acetato foi analisada por HPLC como descrito em Exemplo 11. Adição de 0,5 mg de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* em 1 mL de substrato (1% p/p de tetraacetato de D-xilose) resultou em uma liberação calculada de 89,2 µmol/mL de acetato (Tabela 3). A liberação de acetato por acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* foi calculada das concentrações da amostra de controle (1,9 µmol/mL) e da amostra de acetil-xilano-esterase de *Humicola insolens* (91,1 µmol/mL).

Tabela 3

Amostras	Concentração de acetato (µmol/mL)	Acetato liberado por enzima (µmol/mL)
Controle	1,9	
Acetil-xilano-esterase de <i>Humicola insolens</i>	91,1	89,2

Depósito de Material Biológico

[0289] O seguinte material biológico tem estado depositados sob os termos do Tratado de Budapeste em Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, Peoria, IL, USA, e recebeu o seguinte número de acesso:

Depósito	Número de Acesso	Data do Depósito
<i>E. coli</i> pHinsAXE2	NRRL B-50076	20 de Novembro de 2007

[0290] A cepa tem estado depositada sob condições que garantem que o acesso à cultura estará disponível durante a pendência deste pedido de patente a uma pessoa que tem direito ao mesmo determinado pelas

leis de patente estrangeiras. O depósito representa uma cultura substancialmente pura da cepa depositada. O depósito está disponível conforme exigido pelas leis de patente estrangeiras em países nos quais contra-partes do presente pedido, ou sua progênie estão depositadas. Contudo, deve ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar a presente invenção em derrogação dos direitos de patente concedidos pela ação governamental.

[0291] A presente invenção é adicionalmente descrita pelos seguintes parágrafos numerados:

[0292] [1] Um polipeptídeo isolado tendo atividade de acetil-xilano-esterase, selecionado do grupo consistindo de:

(a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 75% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2;

(b) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições de estringência pelo menos média-alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii);

(c) um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1; e

(d) uma variante compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos (vários) do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0293] [2] O polipeptídeo de parágrafo 1, compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 75% de identidade com

polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0294] [3] O polipeptídeo de parágrafo 2, compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0295] [4] O polipeptídeo de parágrafo 3, compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 85% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0296] [5] O polipeptídeo de parágrafo 4, compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 90% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0297] [6] O polipeptídeo de parágrafo 5, compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 95% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0298] [7] O polipeptídeo de parágrafo 6, compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 97% de identidade com polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0299] [8] O polipeptídeo de parágrafo 1, compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; ou um seu fragmento tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[0300] [9] O polipeptídeo de parágrafo 8, compreendendo ou consistindo da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0301] [10] O polipeptídeo de parágrafo 8, compreendendo ou consistindo do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0302] [11] O polipeptídeo de parágrafo 1, que é codificado por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições de estringência de pelo menos média-alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii).

[0303] [12] O polipeptídeo de parágrafo 11, que é codificado por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições de estringência pelo menos alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii).

[0304] [13] O polipeptídeo de parágrafo 1, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[0305] [14] O polipeptídeo de parágrafo 13, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 80% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[0306] [15] O polipeptídeo de parágrafo 14, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 85% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[0307] [16] O polipeptídeo de parágrafo 15, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[0308] [17] O polipeptídeo de parágrafo 16, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 95% de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[0309] [18] O polipeptídeo de parágrafo 17, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 97% de identidade com a sequência

codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[0310] [19] O polipeptídeo de parágrafo 1, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo ou consistindo da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1; ou uma sua subsequência codificadora de um fragmento tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[0311] [20] O polipeptídeo de parágrafo 19, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo ou consistindo da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1.

[0312] [21] O polipeptídeo de parágrafo 19, que é codificado por um polinucleotídeo compreendendo ou consistindo da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1.

[0313] [22] O polipeptídeo de parágrafo 1, sendo que o polipeptídeo é uma variante compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais aminoácidos (vários) do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0314] [23] O polipeptídeo de parágrafo 1, que é codificado pelo polinucleotídeo contido em plasmídeo pHinsAXE2 que está contido em *E. coli* NRRL B-50076.

[0315] [24] O polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-23, sendo que o polipeptídeo maduro é composto dos aminoácidos 20 a 377 de SEQ ID NO: 2.

[0316] [25] O polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-24, sendo que a sequência codificadora de polipeptídeo maduro é de nucleotídeos 58 a 1266 de SEQ ID NO: 1.

[0317] [26] Um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-25.

[0318] [27] O polinucleotídeo isolado de parágrafo 26, compreendendo pelo menos uma mutação na sequência codificadora de

polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, no qual a sequência de nucleotídeos maduro codifica o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2.

[0319] [28] Um construto de ácido nucleico compreendendo o polinucleotídeo de parágrafo 26 ou 27 operacionalmente ligado em uma ou mais (várias) sequências de controle que dirigem a produção do polipeptídeo em um hospedeiro de expressão.

[0320] [29] Um vetor de expressão recombinante compreendendo o construto de ácido nucleico de parágrafo 28.

[0321] [30] Uma célula hospedeira recombinante compreendendo o construto de ácido nucleico de parágrafo 28.

[0322] [31] Um método de produzir o polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-25, compreendendo: (a) cultivar uma célula, que em sua forma de tipo selvagem produz o polipeptídeo, sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[0323] [32] Um método de produzir o polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-25, compreendendo: (a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo um construto de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[0324] [33] Um método de produzir um mutante de uma célula precursora, compreendendo disruptar ou deletar uma sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-25, que resulta no mutante produzindo menos do polipeptídeo do que a célula precursora.

[0325] [34] Uma célula mutante produzida pelo método de parágrafo 33.

[0326] [35] A célula mutante de parágrafo 34, adicionalmente compreendendo um gene codificador de uma proteína nativa ou heteróloga.

[0327] [36] Um método de produzir uma proteína, compreendendo: (a) cultivar a célula mutante de parágrafo 35 sob condições conducentes para a produção da proteína; e (b) recuperar a proteína.

[0328] [37] O polinucleotídeo isolado de parágrafo 26 ou 27, obtido por (a) hibridização de uma população de DNA sob condições de estringência pelo menos média-alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii); e (b) isolamento do polinucleotídeo hibridizado, que codifica um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[0329] [38] O polinucleotídeo isolado de parágrafo 37, obtido por (a) hibridização de uma população de DNA sob condições de estringência pelo menos alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii); e (b) isolamento do polinucleotídeo hibridizado, que codifica um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase.

[0330] [39] O polinucleotídeo isolado de parágrafo 37 ou 38, sendo que a sequência codificadora de polipeptídeo maduro é de nucleotídeos 58 a 1266 de SEQ ID NO: 1.

[0331] [40] Um método de produzir um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos mutante codificadora de um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase, compreendendo: (a) introduzir pelo menos uma mutação em uma sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, sendo que a sequência de nucleotídeos mutante codifica um polipeptídeo compreendendo ou consistindo do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2; e (b) recuperar o

polinucleotídeo compreendendo a sequência de nucleotídeos mutante.

[0332] [41] Um polinucleotídeo mutante produzido pelo método de parágrafo 40.

[0333] [42] Um método de produzir a polipeptídeo, compreendendo: (a) cultivar uma célula compreendendo o polinucleotídeo mutante de parágrafo 41 codificador do polipeptídeo sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[0334] [43] Um método de produzir o polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-25, compreendendo: (a) cultivar uma célula de planta ou uma planta transgênica compreendendo um polinucleotídeo codificador do polipeptídeo sob condições conducentes à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[0335] [44] Uma planta, parte de planta ou célula de planta transgênica transformada com um polinucleotídeo codificador do polipeptídeo de qualquer um dos parágrafos 1-25.

[0336] [45] Uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) inibitória compreendendo uma subsequência do polinucleotídeo de parágrafo 26 ou 27, sendo que opcionalmente o dsRNA é uma molécula de siRNA ou de miRNA.

[0337] [46] A molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) inibitória de parágrafo 45, que é cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais nucleotídeos dúplices em comprimento.

[0338] [47] Um método de inibir a expressão de um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase em uma célula, compreendendo administrar à célula ou expressar na célula uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), sendo que o dsRNA compreende uma subsequência do polinucleotídeo de parágrafo 26 ou 27.

[0339] [48] O método de parágrafo 47, sendo que o dsRNA é cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais nucleotídeos

dúpliques em comprimento.

[0340] [49] Um construto de ácido nucleico compreendendo um gene codificador de uma proteína operacionalmente ligado em uma sequência de nucleotídeos codificadora de um peptídeo de sinal compreendendo ou consistindo de aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 2, sendo que o gene é estranho à sequência de nucleotídeos.

[0341] [50] Um vetor de expressão recombinante compreendendo o construto de ácido nucleico de parágrafo 49.

[0342] [51] Uma célula hospedeira recombinante compreendendo o construto de ácido nucleico de parágrafo 49.

[0343] [52] Um método de produzir uma proteína, compreendendo: (a) cultivar a célula hospedeira recombinante de parágrafo 51 sob condições conducentes para a produção da proteína; e (b) recuperar a proteína.

[0344] [53] Um método de degradar um material contendo xilano, compreendendo tratar o material contendo xilano com o polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase de qualquer um dos parágrafos 1-25.

[0345] [54] O método de parágrafo 53, adicionalmente compreendendo tratar o material contendo xilano com uma enzima degradadora de xilano.

[0346] [55] O método de parágrafo 54, sendo que a enzima degradadora de xilano é selecionada do grupo consistindo de uma xilanase, feruloil-esterase, arabinofuranosidase, xilosidase, glicuronidase, e uma sua combinação.

[0347] [56] O método de qualquer um dos parágrafos 53-55, sendo que o material contendo xilano é uma ração de animal.

[0348] [57] O método de qualquer um dos parágrafos 53-55, sendo que o material contendo xilano é uma polpa Kraft.

[0349] [58] O método de qualquer um dos parágrafos 53-

55, sendo que o material contendo xilano é uma biomassa lignocelulósica ou celulósica.

[0350] A invenção aqui descrita e reivindicada não é para ser limitada em escopo pelos aspectos específicos aqui revelados, porque estes aspectos são intencionados como ilustrações dos vários aspectos da invenção. Quaisquer aspectos equivalentes são intencionados para estarem dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção em adição às aquelas aqui mostradas e descritas se tornarão evidentes para aquelas pessoas experientes na arte a partir da descrição precedente. Tais modificações são também intencionadas para caírem dentro do escopo das reivindicações anexadas. No caso de conflito, a presente revelação incluindo definições controlará.

REIVINDICAÇÕES

1. Célula microbiana hospedeira recombinante, caracterizada pelo fato de compreender um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase, em que o polinucleotídeo consiste na SEQ ID NO: 1 ou suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo, ou a sequência codificante do polipeptídeo maduro do mesma.

2. Célula microbiana hospedeira recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo consiste na SEQ ID NO: 2 ou no polipeptídeo maduro da mesma.

3. Célula microbiana hospedeira recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo maduro consiste nos aminoácidos de 20 a 377 da SEQ ID NO: 2.

4. Célula microbiana hospedeira recombinante de acordo qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é codificado pelo polinucleotídeo contido no plasmídeo pHinsAXE2, que está contido na *E.coli* NRRL B-50076.

5. Método para produzir um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano esterase, caracterizado pelo fato de compreender: (a) cultivar a célula microbiana hospedeira recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 para a produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

6. Método para produzir um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano esterase, caracterizado pelo fato de compreender: (a) cultivar uma planta transgênica ou uma célula de planta transgênica compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano esterase, em que o polinucleotídeo consiste na SEQ ID NO: 1 ou suas sequências degeneradas que codificam o mesmo polipeptídeo, ou a sequência codificante do polipeptídeo maduro da mesma, para produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo consiste na SEQ ID NO: 2 ou no polipeptídeo maduro da mesma.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo maduro consiste nos aminoácidos de 20 a 377 da SEQ ID NO: 2.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é codificado pelo polinucleotídeo contido no plasmídeo pHinsAXE2, que está contido na *E. coli* NRRL B-50076.

10. Método para produzir uma proteína, caracterizado pelo fato de compreender: (a) cultivar a célula hospedeira microbiana recombinante sob condições conducentes para a produção da proteína, em que a célula hospedeira microbiana recombinante compreende um gene codificando uma proteína operavelmente ligada a uma sequência de ácido nucleico consistindo nos nucleotídeos 1 a 57 da SEQ ID NO: 1 codificando um peptídeo de sinal consistindo nos aminoácidos 1 a 19 da SEQ ID NO: 2, em que o gene é exógeno à sequência de nucleotídeos; e (b) recuperar a proteína.

11. Método de degradar um material contendo xilano, caracterizado pelo fato de compreender tratar o material contendo xilano com o polipeptídeo tendo atividade de acetil-xilano-esterase consistindo na SEQ ID NO: 2, ou o polipeptídeo maduro da mesma.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo maduro consiste nos aminoácidos de 20 a 377 da SEQ ID NO: 2.

13. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é codificado pelo polinucleotídeo contido no plasmídeo pHinsAXE2, que está contido na *E. coli*

NRRL B-50076.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender tratar o material contendo xilano com uma enzima degradadora de xilano.

1 M K V P T L I S S L L A L V S F S E A C P L I K
 ATGAAGTCCCGACCTCCTCGAGCCTCCTGGCTCTGGTCTCTCCCGAGGCCAAGCGGCTCATCRAG
 73 R A T L T R V N N F G N N F S G A R M U I Y V F
 CGAGCGACGCTCAGCGGGTCAACAACCTCGGTAAACAACCTAGCGGTGGCGCATGTACATCTATGTGCC
 145 D R L Q P R P A V L T A V H Y C T G T A N A F Y
 GACAGGCTTCAGCCCAAGTCCGCGTCTCAGCGCGTCTCACTAGCGGCGACCGCCAAAGCCTTCTAC
 217 T G T P Y A R L A D Q Y G F I V V Y P H S P N N
 ACCGGTACTCCGTATGCTGCTGTCGCGACCATAGTGGCTTCATTCGCTACCGGAGTCTCCCATPAC
 259 G G C W D V S S R A A Y T R D S G S N H A I S
 GCGGTTGCTGGGATGCTGTCGCGCGCTGCTACACCGCGATAGCGGTTCACACGACCGCCTTCT
 361 L M T K W A L Q Q Y N G D P E K V F V A G T S S
 CTCATGACGAAGTGGGCTCTGCAGCAATATATGTTGACCCAGAGAGGTCTTGTGTCGCGCACCGCTCG
 433 G A M M T - - - - - - - - - - - - - - - - - -
 GCGGCTATGATGACGGTGGAGTGACACAGAGATGAGGCTCAAGTGTGGTCAAGCTACCTTGTCCCGGTACTG
 505 - - - - - N V L S A V Y P D L Y K A A A A Y A G
 ACACCTGTCTCACCAGAAATGTTCTCTGCTGTGTACCTGATCTGTACAGGCTGCCCTGCTACGCTGG
 577 V P A G C C F Y T G T V A G W N S T C A N G Q S I
 TGTCCCTGCGGCTGCTTCTACACGGCGACTGTTGCTGGTGGACTCGACTTGGCGGACCGGCGAGTCCAT
 649 T T Q E H W A R T A L D M Y P G Y T G P R M
 TACCACACGGAACACTGGGCGCGACGCGGCTCGATATGATACCTGGCTACACCGGCGCGGCTCCACGCA
 721 L I Y H G S A D T T I Y P R - - - - - - - -
 GGTCACTACCAACGCTCCGCTGACACGACCATCTATCTCGGTAAGCGCTATGCGCCGCCAAAGCAGGC
 793 - - - - - - - - - - N F N E T L K Q Y A G V F
 TATTGGACCTCCCAATACTGACACCGCGCAGACTTCACGAGACTCTGAAGCAGTGGCGGCGGTTTC
 865 G Y T Y G Q P Q Q T L P N T P S A F Y T K Y V Y
 GGTACACTTACGGCGAGCTCAGACACCTCCCGAACACCGGCTCGCGGCTTACACCAAGTATGTCTAC
 G P N L V G I Y G S G V T H N I P V N C A N D M

Fig. 1A

937 GGGCCCAACCTCGTCCGGCATCTACGGCAGCGGGGTACCCACACATCCCCGTCAACGGCGCCACGACATG
E W F G I T G N P T T T S T S A T V P T T S S
1009 GAATGGTTCCGGCATCACCGGCAACCCGACCCACCTCGACGCTCTGCTACTGTGCTTACTTACACGAGCAGC
P G T T S T S A P V T T T T S R A P P P T Q T
1081 CCGGGCACCACTCGACCAAGCGCCCGGTACACACGACACCTCCCGGGTCCCTCCCTCTACCCAGACT
C I F V P R W G Q C G G I T W G G C T V C E A P
1153 TGTATACCCCTTCCTCGTTGGGGCCAGTGGCGGGCATCACCTCGGGAGGCTCCACGGTGTGGAGGGCGCG
Y T C Q K L N D W Y S Q C L *
1225 TACACTGCCAGAGCTGAATGATTGGTACTCTCAGTGCCTGTAA

Fig. 1B

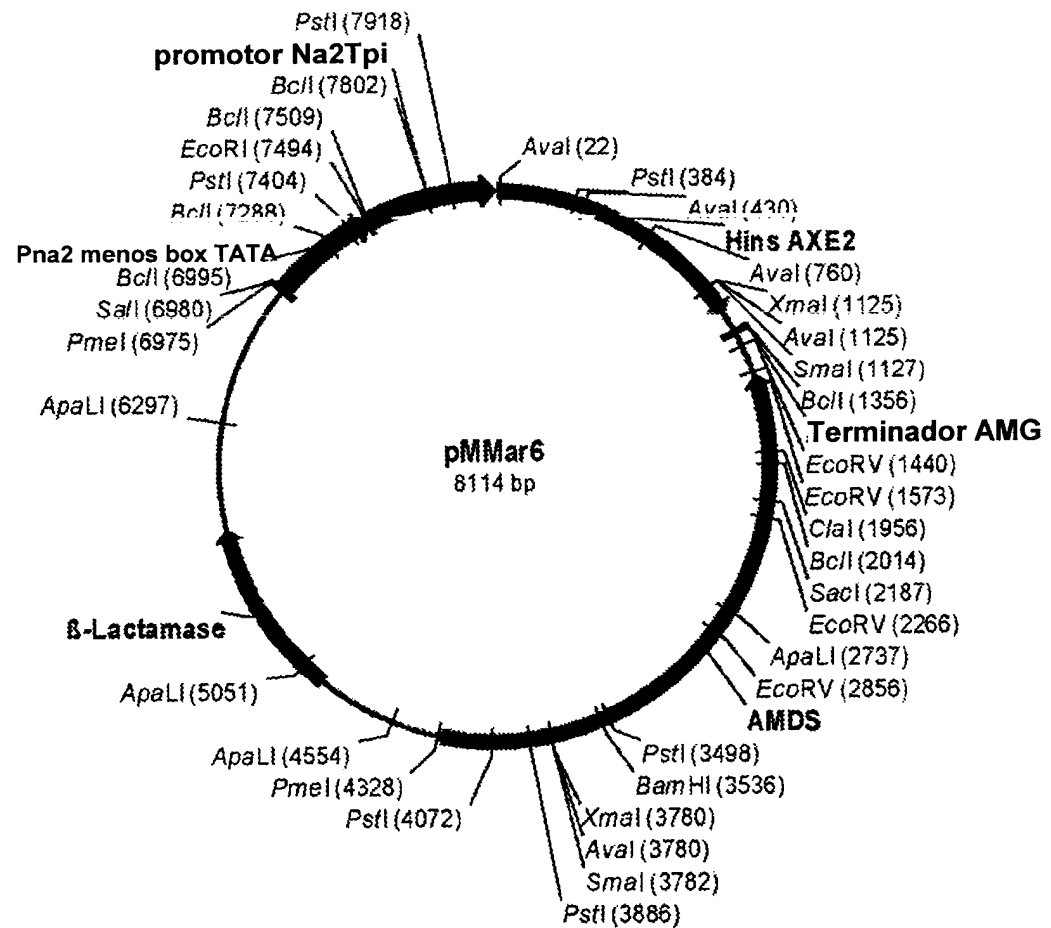


Fig. 2

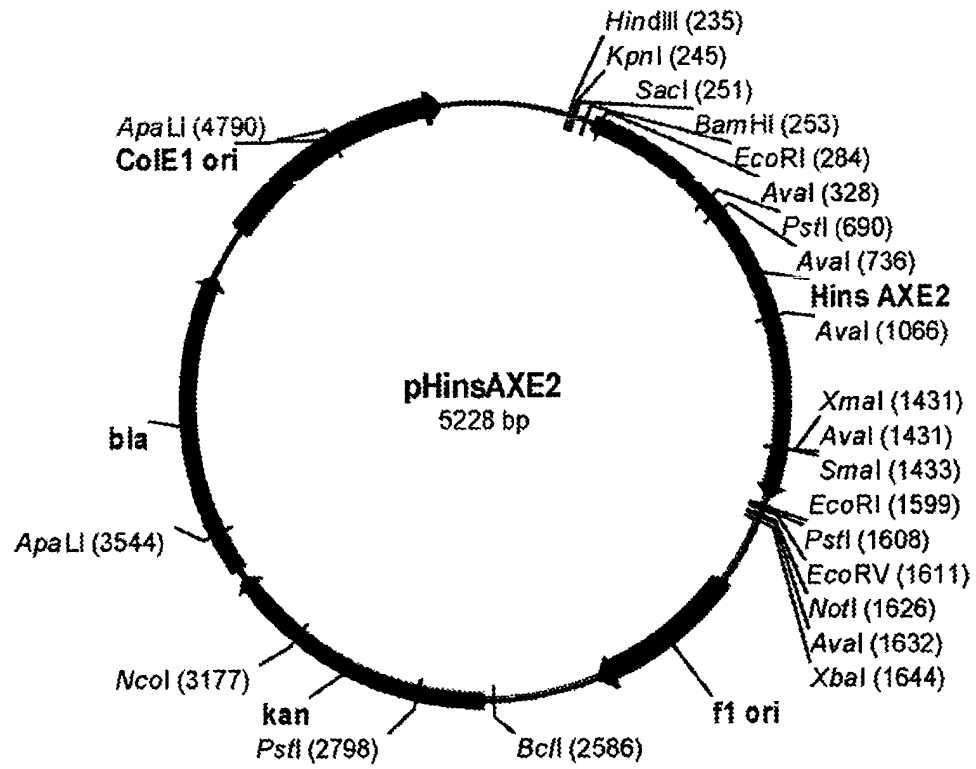


Fig. 3