



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

(11) PI 0908879-2 B1



(22) Data do Depósito: 02/03/2009

(45) Data de Concessão: 09/07/2019

(54) Título: MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DE PLANTA, COQUETEL DE DEGRADAÇÃO DE PLANTAS, MATERIAL DE PLANTA HOMOGENEIZADO E COQUETEL DE ENZIMAS

(51) Int.Cl.: C12N 15/52.

(30) Prioridade Unionista: 29/02/2008 US 61/032,536.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF CENTRAL FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC..

(72) Inventor(es): HENRY DANIELL.

(86) Pedido PCT: PCT US2009035753 de 02/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/108941 de 03/09/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/08/2010

(57) Resumo: PRODUÇÃO E USO DE MATERIAIS DE DEGRADAÇÃO DE PLANTA São aqui revelados materiais úteis para a degradação de biomassa de material de planta. Em modalidades exemplares, o material de planta compreende uma ou mais enzimas que são expressas em plantas e/ ou bactérias. São especificamente aqui exemplificadas enzimas de degradação de plantas expressas em cloroplastos. As enzimas expressas em cloroplasto podem ser fornecidas como coquetéis para uso em conjunto com métodos convencionais de conversão de biomassa em biocombustíveis, por exemplo, etanol celulósico.

**MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DE PLANTA, COQUETEL DE DEGRADAÇÃO DE
PLANTAS, MATERIAL DE PLANTA HOMOGENEIZADO E COQUETEL DE ENZIMAS**
FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A composição e a diversidade de biomassa para a produção
5 de etanol celulósico exigem múltiplos sistemas enzimáticos,
em concentrações muito elevadas, para liberar açúcares
constituintes dos quais o etanol celulósico é feito. Todas as
enzimas atualmente disponíveis para etanol celulósico são
produzidas em sistemas de fermentação caros e são purificadas
10 em um processo muito similar às substâncias biofarmacêuticas
como insulina. Portanto, enzimas de grau de reagente para a
produção de etanol são extremamente caras. Por exemplo, B-
glicosidase, pectoliase e celulase são vendidas atualmente
por Novozyme através do catálogo Sigma por U\$ 124.000, U\$
15 412.000 e U\$ 40.490 por kg, respectivamente. Essas enzimas
são vendidas como formulações para biorrefinarias sem a
revelação dos reais componentes enzimáticos. Portanto, o
custo real para cada enzima, vendida em quantidades
volumosas, não é disponível publicamente. A maioria das
20 estimativas industriais para enzimas para a produção de
etanol celulósico está na faixa de U\$ 2 a U\$ 3 por cerca de
3,78 litros, o que torna o custo do uso em grande escala
proibitivo. A capacidade atual de sistemas de fermentação
também constitui uma limitação importante. Com o aumento da
25 demanda por enzimas e pela capacidade de produção limitada, o
custo da enzima provavelmente aumentará ainda mais.

Uma limitação importante para a conversão dessa
biomassa em etanol é o alto custo e as grandes quantidades
de enzimas necessárias para a hidrólise. B-glicosidase,
30 pectoliase e celulase são vendidas atualmente por Novozyme

ou outras indústrias através do catálogo de Sigma por U\$ 124.000, U\$ 412.000 e U\$ 40.490 por kg, respectivamente. Portanto, o Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE) há muito identificou o custo das enzimas e seus altos níveis de carga necessários para a maioria das matérias-primas lignocelulósicas como uma das barreiras principais à produção de etanol celulósico. Atualmente, todas as enzimas disponíveis comercialmente são produzidas através de um processo de fermentação. Infelizmente, a construção e a manutenção do processo de produção de fermentação são muito caras, custando 500-900 milhões de dólares em investimentos prévios. Ainda não surgiu uma alternativa viável à tecnologia de fermentação para as enzimas industriais cruciais para a produção em massa, ainda proibitivamente caras. Esse vazio no mercado por um processo alternativo é preenchido diretamente por essa proposta.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 (a) Representação esquemática da região *trnI/trnA* 16S do cloroplasto. Os transgenes foram inseridos na região espaçadora *trnI/trnA* no genoma do cloroplasto do tabaco. **(b)** Representação esquemática dos vetores de transformação do cloroplasto. O gene de interesse (GOT) é *celD*, *celO*, *pelA*, *pelB*, *pelD*, *cutinase*, *lipY*, *egl1*, *egl*, *swol*, *xyn2*, *axel* ou *bgl1*. *Prrn*, promotor de óperon de rRNA; *aadA*, o gene de aminoglicosídeo 3'-adeniltransferase confere resistência à espectinomicina; UTR 5', promotor e região 5' não traduzida do gene *psbA*; UTR 3', região não traduzida 3' do gene *psbA*. **(c)** Avaliação da integração do transgene e homoplasma por *Southern-blot* de linhagens transplastômicas *pelB*, **(d)** *pelD* e **(e)** *celD* hibridizadas com

a sonda da sequência flanqueadora (1, não transformadas; 2 a 4, linhagens transplastômicas). (f) Fenótipos de linhagens não transformadas (UT) e transplastômicas desenvolvidas em estufa que mostram crescimento normal.

5 **Figura 2** Análise Western blot e quantificação de linhagens transplastômicas. Western blot de linhagens transplastômicas que expressam (a) PelB ou (b) PelD. UT: não transformadas, folhas maduras colhidas às 10 da manhã, 2 da tarde, 6 da tarde e 10 da tarde; 5 ng, 10 ng e 25 ng: 10 proteína PelA purificada, folhas jovens, maduras e velhas. (c) Unidades de enzima de PelB e PelD (c) ou CelD (d) de um g ou 100 mg de folha de idades ou momentos de colheita diferentes.

15 **Figura 3** Efeito de substrato, pH, temperatura e cofatores sobre a atividade enzimática de cpPelB, rPelB, cpPelD, rPelD, rCelD e cpCelD. (a) Efeito de concentrações crescentes de PGA sobre a atividade de pectato liases. (b) Efeito do pH sobre a atividade de pectato liases na ausência de CaCl_2 e (c) na presença de CaCl_2 . Os tampões 20 foram os seguintes: 50 mM de tampão fosfato (pH 6-7), tampão de Tris-HCl (pH 8), tampão de glicina/NaOH (pH 9) e tampão CAPS (pH 10,0) com 4 μg de TSP de PelB e PelD de planta e de *E. coli*. O pH ótimo foi determinado a 40°C usando 2,5 mg/ml de PGA como substrato. (d) Efeito da 25 temperatura (30-70°C) sobre a atividade enzimática em pH 8,0 na ausência de CaCl_2 e (e) na presença de CaCl_2 . (f) Otimização do pH para atividade de cpCelD e rCelD usando CMC (2%) a 60°C por 30 minutos. A atividade relativa (%) foi medida com referência à atividade máxima obtida com 25 30 $\mu\text{g/ml}$ para cpCelD e 10 $\mu\text{g/ml}$ para rCelD. (g) Efeito de

temperaturas crescentes sobre a atividade relativa de cpCelD e rCelD usando CMC (2%) por 30 minutos em pH 6,0. A atividade relativa (%) foi medida com referência à atividade máxima obtida com 25 µg/ml para cpCelD e 10 µg/ml para rCelD. (h) Aumento da atividade de cpCelD (reação de 25 µg de TSP/ml) usando 10 mM de CaCl₂ e 20 µg/ml de BSA individualmente ou em combinação com 50 mM de acetato de sódio durante a hidrólise enzimática prolongada. A hidrólise foi realizada até 36 horas a 60°C, pH 6,0, na presença de CMC (2%).

Figura 4 Enzimas derivadas de *E. coli* vs. cloroplasto em diferentes concentrações de proteína de extratos brutos. (a) Cinética enzimática de cpCelD e rCelD usando substrato de carboximetil celulose (2%). A mistura de reação continha concentrações crescentes de cpCelD e rCelD TSP (µg/ml) com 10 mM de CaCl₂ e 50 mM de tampão de acetato de sódio, pH 6,0. A hidrólise enzimática foi realizada por 30 minutos a 60°C. O detalhe da Figura mostra o ponto de saturação da cinética enzimática para quantidade TSP de cpCelD (µg/ml) em direção a CMC (2%). Os tubos de Eppendorf com mistura de reação mostrados no detalhe representam, 1 planta não transformada, 2 e 3 TSP de 10 µg de rCelD e cpCelD. (b) Efeito de cpPelB, cpPelD, rPelB e rPelD sobre a hidrólise de substrato de 5,0 mg/ml de poligalacturonato de sódio. A mistura de reação continha concentrações crescentes de cpPelB, cpPelD, rPelB e rPelD (µg/ml) em 20 mM de tampão de Tris-HCl (pH 8,0). Poligalacturonato de sódio (Sigma) foi medido usando o método de DNS e medido a partir do gráfico-padrão de ácido D-galacturônico. A hidrólise enzimática foi realizada por 2 horas a 40°C em um misturador rotatório a

150 rpm.

Figura 5 Coquetéis de enzimas para papel de filtro, madeira processada e casca de cítricos. (a) A atividade no papel de filtro foi determinada usando uma tira de papel de filtro Whatman N° 1 (ensaio de 50 mg/ml) em pH 5,5 e 50°C. Diferentes combinações de extratos brutos contendo rEgl (100 µg/ml), rBgl1 (200 µg/ml), rSwol (120 µg/ml), rCelo (100 µg/ml) e cpCelD (100 µg/ml) foram usadas no coquetel. As amostras foram incubadas com 10 mM de CaCl₂, 20 µg de BSA em um misturador rotatório a 150 rpm por 24 horas. (b) A hidrólise da amostra de madeira processada (reação de 200 mg/5 ml) foi feita pela utilização de um coquetel de extratos brutos de cpPelB (250 µg/ml), cpPelD (250 µg/ml) (em pH 8,0), cpCelD (200 µg/ml), cpXyn2 (200 µg/ml), rEgl (100 µg/ml), rBgl1 (200 µg/ml), rSwol (120 µg/ml), rCelo (100 µg/ml), rAxe1 (100 µg/ml), rPelA (200 µg/ml), rCutinase (50 µg/ml), rLipY (100 µg/ml). A mistura de reação contendo 10 mM de CaCl₂, 20 µg/ml de BSA foi incubada por 36 horas em um misturador rotatório a 150 rpm; pH (5,5-8,0) e temperatura (40°C-50°C) foram ajustados com base nas condições ótimas. A análise do ponto final da liberação de equivalentes de glicose foi determinada usando o método de DNS. (c) A hidrólise de casca de laranja Valência (reação de 200 mg/5 ml) foi feita usando um coquetel de extratos brutos de cpPelB (250 µg/ml), cpPelD (250 µg/ml), cpCelD (100 µg/ml) e cpXyn2 (100 µg/ml), rEgl (100 µg/ml), rBgl1 (200 µg/ml), rSwol (120 µg/ml), rCelo (100 µg/ml) e cpCelD (100 µg/ml), rAxe2 (100 µg/ml), rCutinase (50 µg/ml), rLipY (100 µg/ml), rPelA (200 µg/ml). A análise do produto final de açúcar redutor foi determinada usando

reagente de DNS ³¹ e D-glicose e ácido D-galacturônico como padrões. Ampicilina e canamicina a 100 µg/ml foram adicionadas para evitar qualquer crescimento microbiano durante hidrólise. As amostras foram incubadas com 10 mM de CaCl₂, 20 µg/ml de BSA em um misturador rotatório a 150 rpm por 24 horas; o pH (5,5-8,0) e a temperatura (40°C-50°C) foram ajustados com base em condições ótimas. Em todos os experimentos, ensaios de controle continham substrato sem enzima ou enzima sem substrato. Todos os experimentos e ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 6 Geração de cultivares comerciais transplastômicos de tabaco (A) Enraizamento de broto de CelD LAMD (B) plantas transplastômicas de CelD LAMD que crescem na estufa (C) plantas transplastômicas de CelD LAMD que mostram floração normal (D) transformante primário de CelD TN90 (E) Segunda rodada de regeneração para CelD TN90 (F) Enraizamento de PelB TN90 (G-I) Primeira, segunda e terceira rodada de regeneração para PelB LAMD (J) Enraizamento de broto de PelD LAMD (K) plantas transplastômicas PelD LAMD que crescem em estufa (L) planta transplastômica PelD LAMD que mostra floração normal (M) Enraizamento de broto eg1 LAMD (N) planta transplastômica eg1 LAMD que cresce em potes.

Figura 7 Confirmação de homoplasma por *southern-blots* usando sonda flanqueadora de tabaco (A) CelD LAMD (B) PelB LAMD (C) PelB TN90 (D) PelD LAMD e (E) eg1 LAMD (UT: Planta não transformada; Números: Linhagens transplastômicas e B: Branco).

Figura 8 Atividade enzimática de pectato liase B e D em cultivares de tabaco Petit Havana, TN90 e LAMD (A) PelB

(B) PelD. Observação: o material de folha usado para a análise da atividade enzimática para cultivares de tabaco TN90 e LAMD foi colhido de plantas *in vitro*, enquanto o material de folha para Petit Havana é da estufa. Na medida em que o transgene é controlado por psbA, com a luz e elementos reguladores do desenvolvimento, espera-se que os níveis de expressão em cultivares comerciais sejam maiores quando transferidos para a estufa.

A Figura 9 mostra informação de sequência de alguns exemplos de genes de composto de degradação de plantas.

DESCRIÇÃO GERAL

Algumas modalidades da invenção abordam os problemas principais discutidos acima por produção de todas as enzimas necessárias em plantas ou bactérias ou uma combinação de ambas, aliviando dramaticamente, dessa forma, o custo da fermentação e purificação. De acordo com uma modalidade, a invenção pertence a um método de degradação de uma amostra de biomassa de planta de modo a liberar açúcares fermentáveis nessa amostra. O método envolve a obtenção de um coquetel de degradação de plantas que compreende pelo menos dois extratos celulares, cada extrato celular possuindo um composto ativo de degradação de plantas que foi recombinantemente expresso em células das quais cada um dos referidos extratos celulares é derivado. Os (pelo menos) dois extratos celulares são extratos de planta ou extratos bacterianos, ou uma combinação de ambos. O coquetel de degradação de plantas é misturado com a amostra de biomassa para a liberação de açúcares fermentáveis. Em uma modalidade mais específica, o coquetel de degradação de plantas inclui extratos celulares que

incluem enzimas de degradação de plantas como, por exemplo, celulase, ligninase, beta-glicosidase, hemicelulase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase, pectato liase, lipase, alfa-amilase maltogênica, pectoliase, ou compostos
 5 que facilitam o acesso dessas enzimas, ou os denominados compostos de degradação de plantas acessórios, que incluem, sem limitação, cutinase ou expansina (por exemplo, swolenina). Os inventores verificaram que esses compostos de degradação de plantas acessórios servem para facilitar a
 10 ação de enzimas de degradação de plantas que elevam sinergicamente a quantidade de açúcares fermentáveis produzida para certa amostra de biomassa.

Extratos de células de planta incluirão, na maioria dos casos, uma quantidade de ribulose-1,5-bisfosfato
 15 carboxilase oxigenase (rubisco) das células de plantas das quais os extratos de células de planta são derivados. Rubisco é a enzima mais prevalente no planeta, sendo responsável por 30-50% da proteína solúvel total no cloroplasto; ela fixa dióxido de carbono, mas a atividade
 20 de oxigenase limita severamente a fotossíntese e produtividade do cultivo (Ogren, W.L. (2003) *Photosynth. Res.* 76, 53-63, 2. Spreitzer, R.J. e Salvucci, M.E. (2002) *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 449-475). Rubisco consiste em oito subunidades grandes (LSUs) e oito subunidades pequenas
 25 (SSUs). A SSU é importada do citosol, e ambas as subunidades passam por várias modificações pós-tradução antes da montagem em holoenzima funcional (Houtz, R.L. e Portis, A.R. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 150-158).

O uso de transformação genética de plantas geralmente
 30 não é considerado uma alternativa viável aos processos

convencionais de fermentação para a produção de enzimas de
degradação de plantas à luz do fato de que as proteínas
expressas seriam deletérias à vida e ao crescimento da
planta. Os inventores esforçaram-se para criar um método de
5 expressão de enzimas de degradação de plantas de tal forma
que não rompa a célula da planta. Os inventores acreditam
que a presente invenção seja a primeira demonstração da
expressão viável de uma enzima de degradação de plantas em
plantas. Os inventores perceberam que a expressão de muitas
10 enzimas de degradação de plantas pode ser expressa em
cloroplastos, sem efeitos adversos na planta. Os
cloroplastos parecem isolar a célula da planta de danos
decorrentes das enzimas. Embora a expressão em cloroplastos
seja aqui exemplificada, a menos que especificamente
15 definido, as modalidades da presente invenção não devem ser
consideradas como estando limitadas à expressão em
cloroplasto de enzimas de degradação de plantas. Algumas
modalidades estão relacionadas a uma combinação de extratos
de plantas e bacterianos de células criadas geneticamente
20 para expressar recombinantemente um composto de degradação
de plantas(s).

O termo "expresso recombinantemente", como aqui usado,
refere-se à produção de um polipeptídeo a partir de um
polinucleotídeo que é heterólogo à célula na qual o
25 polinucleotídeo foi transfectado. A expressão recombinante
pode resultar de polinucleotídeos heterólogos que são
transformados estavelmente no genoma da célula, ou no
genoma da organela da célula, ou que simplesmente estão
presentes na célula por meio de um evento de transfecção.

30 O termo "cloroplasto" é interpretado de forma ampla

para cobrir todos os plastídios, incluindo proplastídios, etioplastos, cloroplastos maduros e cromoplastos.

Um sistema de celulase abrangente consiste em endoglucanases, celobiohidrolases e beta-glicosidases. As celobiohidrolases e endoglucanases funcionam sinergicamente para degradar a celulose em celobiose, que é então hidrolisada em glicose pelas beta-glicosidases. A atividade de celobiase, ou beta-glicosidase, é responsável pela formação de glicose a partir de celobiose e tem um papel importante na degradação de celulose por liberação da inibição do produto final (celobiose). As sequências gênicas para a maioria dessas enzimas, de diferentes microorganismos, foram depositadas em bases de dados públicas.

Pectinas, ou substâncias pécticas, são nomes coletivos para uma mistura de polissacarídeos heterogêneos, ramificados e altamente hidratados presentes como um dos componentes principais nas paredes de células de plantas. Esses polissacarídeos compreendem principalmente açúcares neutros, por exemplo, arabinano, galactano, andarabino galactano. Preparações de enzimas pectolíticas ativas possuem as seguintes enzimas: duas alfa-L-ramnohidrolases, poligalacturonase, pectina metilesterase, endo-pectato liase (pectina-transeliminase), pectina liase e um pequeno percentual de xilanase. A sequência de nucleotídeos para enzimas de degradação de pectina, xilanases, celulases, estão disponíveis em bases de dados públicas. Veja o Exemplo 9 dessa especificação para uma discussão sobre sequências.

O inventor percebeu que as necessidades de enzima são

.
.
.
muito diferentes para cada tipo de biomassa usada na
produção de etanol celulósico. Consequentemente, certas
modalidades da presente invenção estão relacionadas aos
coquetéis de enzimas obtidos a partir da expressão em
5 plantas e/ou expressão em bactérias que os inventores
desenvolveram como sendo particularmente eficazes para o
material de biomassa visado.

As fontes de biomassa que podem ser degradadas para a
produção de etanol de acordo com os ensinamentos aqui
10 apresentados incluem, sem limitação, grãos como, por
exemplo, milho, trigo, centeio, cevada e os resíduos de
grãos obtidos a partir destes (primariamente material
residual como, por exemplo, talos, folhas e cascas),
beterraba, cana de açúcar, gramas como, por exemplo, capim-
15 elefante e *Miscanthus*, madeiras como, por exemplo, árvores
de álamo, eucalipto, salgueiro, liquidâmbar e robínia,
entre outras, e resíduos florestais (por exemplo, lascas e
serragem de serrarias). Outras biomassas podem incluir, sem
limitação, frutas, incluindo cítricos, e resíduos destes,
20 por exemplo, casca de cítricos.

Ao longo deste documento, tabaco é citado como uma
planta exemplar para a expressão de enzimas de degradação
de plantas. No entanto, a menos que especificamente
definido, as modalidades da invenção não devem ser
25 consideradas como limitadas à expressão em tabaco. Os
ensinamentos sobre expressão gênica aqui apresentados podem
ser aplicados em uma ampla gama de plantas, que incluem,
sem limitação, tabaco; alface, espinafre; girassol;
cultivos de leguminosas como, por exemplo, soja, feijão,
30 ervilhas e alfafa; tomate; batata; cenoura; beterraba;

cultivos de crucíferas; cultivos de fibras como, por exemplo, algodão; cultivos hortícolas como, por exemplo, gérbera e crisântemo; colza; e linhaça.

Em uma modalidade, genes de *Aspergillus niger*,
5 *Aspergillus aculeatus*, *Trichoderma reesei* e/ou *Clostridium thermocellum* que codificam classes diferentes de enzimas são isolados usando iniciadores gene-específicos. A fim de expressar classes diferentes de genes em um cloroplasto de interesse, as estratégias seguintes são usadas. O vetor de
10 cloroplasto contém sequências flanqueadoras do genoma do cloroplasto para facilitar a recombinação homóloga. Em uma modalidade, genes estranhos são integrados individualmente na região espaçadora do genoma do cloroplasto. A sequência codificadora de diferentes enzimas pode ser regulada por
15 sequências reguladoras apropriadas. Plasmídeos recombinantes serão bombardeados em tabaco para obter plantas transplastômicas.

Em uma modalidade específica, folhas de tabaco em pó são usadas como fontes de enzima para avaliação comercial
20 de produção de etanol a partir de uma fonte de biomassa. Em uma modalidade mais específica, a fonte de biomassa é um grão como, por exemplo, milho, uma grama ou resíduos de cítricos.

Para cloroplastos que são transformados, percebeu-se
25 que a obtenção de homoplasma com relação aos cloroplastos transgênicos é desejada. A integração do transgene e homoplasma são confirmadas por PCR e análise *Southern-blot*, respectivamente. A Expressão dos transgenes é confirmada por análise *western blot* e quantificada por
30 ELISA. O extrato de proteína de plantas transplastômicas de

tabaco é testado quanto à sua habilidade para degradar biomassa de resíduos de cítricos. Com base nos resultados, mais classes de enzimas são adicionadas para aumentar a degradação da biomassa de planta em açúcares para fermentação em etanol. Cada planta de tabaco, criada geneticamente para produzir uma enzima, será capaz de produzir um milhão de sementes, para facilitar o aumento de escala até 100 acres, se necessário. Material homogeneizado de planta, por exemplo, folhas de tabaco em pó ou extratos de planta, ou enzimas purificadas de material de planta, é usado como a fonte de enzima para a avaliação comercial da produção de etanol a partir de resíduos de cítricos.

Embora os métodos atuais envolvam a colocação de um gene estranho no núcleo da célula de planta, CT transforma o genoma dos aproximadamente 100 cloroplastos que estão dentro de cada tabaco célula de planta. Cada cloroplasto da planta de tabaco contém cerca de 100 cópias do material genético do cloroplasto e, portanto, a quantidade de proteína (nesse caso, proteínas de enzima usadas para degradar a biomassa em açúcar para a produção de etanol) é aumentada exponencialmente. Esta é a razão primária pela qual a produção em volume maciço de enzimas de degradação da parede celular para a produção de etanol celulósico tem o custo tão compensador. Em segundo, o tabaco possui grande volume de biomassa (40 toneladas métricas de folhas por acre) e pode ser colhido várias vezes durante certa estação estival de crescimento na Flórida. E, como mencionado previamente, é fácil plantar 100 acres a partir de uma única planta de tabaco. Por último, como os cloroplastos são herdados pela mãe, eles não são funcionais no pólen da

planta de tabaco.

De acordo com uma modalidade, a invenção pertence a um método de degradação de uma amostra de biomassa de planta para a liberação de açúcares fermentáveis. O método inclui a obtenção de um coquetel de degradação de plantas que possui pelo menos um genoma do cloroplasto ou segmento do genoma que possui um gene heterólogo que codifica celulase, ligninase, beta-glicosidase, hemicelulase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase, pectato liase, cutinase, lipase ou pectoliase, ou uma combinação destas; e em que o referido material de planta possui celulase, ligninase, beta-glicosidase, hemicelulase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase, pectato liase, cutinase, lipase, alfa-amilase maltogênica, pectoliase ou expansina, ou uma combinação destas, que foi expressa em uma planta da qual o referido material de planta é derivado; e mistura do referido material de degradação de planta com a referida amostra de biomassa. Em uma modalidade mais específica, a enzima ou combinação de enzimas pertence a mais de 0,1 por cento da proteína total no material de planta.

De acordo com outra modalidade, a invenção pertence a um método de produção de um material de degradação de biomassa de planta suficiente para a liberação de açúcares fermentáveis, o método incluindo a produção de pelo menos uma planta que compreende cloroplastos que expressam celulase, ligninase, beta-glicosidase, hemicelulase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase, pectato liase, cutinase, lipase, alfa-amilase maltogênica, pectoliase ou expansina, ou uma combinação destas; a colheita da referida planta; e o processamento da referida planta para produzir

uma fonte de enzima adequada para mistura e degradação de uma amostra de biomassa. Em uma modalidade específica, a planta é tabaco; alface, espinafre; girassol; cultivos de fibras como, por exemplo, algodão; cultivos hortícolas como, por exemplo, gérbera e crisântemo; cultivos de leguminosas como, por exemplo, soja, feijão, ervilhas, e alfafa; tomate; batata; beterraba; cultivos de crucíferas, incluindo colza; e linhaça. Em uma modalidade mais específica, a planta é tabaco.

10 Um aspecto da invenção é o fornecimento de uma fonte abundante barata de enzima para a degradação de biomassa. Consequentemente, o material de planta ou bacteriano no qual os compostos de degradação de plantas foram expressos pode ser processado por secagem e pulverização da planta ou
15 uma porção desta. Em outra modalidade, extratos líquidos brutos são produzidos a partir do material de planta e/ou bacteriano. Em modalidades alternativas, o material de degradação de planta pode ser enzimas que foram purificadas total ou parcialmente da planta e/ou bactérias nas quais
20 são expressas. No entanto, o fornecimento do material de degradação de planta como uma forma seca ou como extrato bruto do material de planta e/ou bacteriano evita a necessidade de etapas de purificação demoradas e potencialmente caras. Dessa forma, o material de planta
25 possui uma vida útil mais longa e pode facilmente ser misturado com a amostra de biomassa de planta de acordo com processos convencionais de degradação e fermentação de plantas.

Em uma modalidade específica, o método de produção de
30 a planta envolve a produção de uma primeira planta com

cloroplastos transformada para expressar uma primeira enzima e uma segunda planta com cloroplastos transformada para expressar uma segunda enzima. O material de planta da primeira e da segunda plantas pode ser combinado para 5 produzir uma amostra de degradação de planta que inclui mais de uma enzima de degradação de plantas. Em uma modalidade mais específica, a invenção pertence a um método de produção de uma planta que envolve pelo menos dois dos seguintes: produção de uma primeira planta que compreende 10 cloroplastos que expressam celulase, produção de uma segunda planta que compreende cloroplastos que expressam ligninase, produção de uma terceira planta que compreende cloroplastos que expressam beta-glicosidase; produção de uma quarta planta que compreende cloroplastos que expressam 15 hemicelulase; produção de uma quinta planta que compreende cloroplastos que expressam xilanase; produção de uma sexta planta que compreende cloroplastos que expressam alfa-amilase; produção de uma sétima planta que compreende cloroplastos que expressam amiloglicosidase; produção de 20 uma oitava planta que compreende cloroplastos que expressam pectato liase; produção de uma nona planta que compreende cloroplastos que expressam cutinase; produção de uma décima planta que compreende cloroplastos que expressam lipase; produção de uma décima primeira planta que compreende 25 cloroplastos que expressam alfa-amilase maltogênica, produção de uma décima segunda planta que compreende cloroplastos que expressam pectoliase e/ou uma décima terceira planta que compreende cloroplastos que expressam expansina (por exemplo, swolenina).

30 Como citado acima, os inventores reconheceram que, de

.
acordo com certas modalidades, enzimas derivadas de plantas
. são aumentadas com enzimas de degradação de plantas
. expressas recombinantemente em bactérias. Dessa forma, um
coquetel de degradação de plantas pode incluir enzimas
5 expressas recombinantemente em plantas e enzimas que são
expressas recombinantemente em bactérias, como, por
exemplo, sem limitação, *E. coli*.

De acordo com uma modalidade adicional, a invenção
pertence a um material de planta útil para a degradação de
10 uma biomassa de planta, o material incluindo pelo menos um
genoma do cloroplasto ou segmento do genoma que possui um
gene heterólogo que codifica celulase, ligninase, beta-
glicosidase, hemicelulase, xilanase, alfa-amilase,
amiloglicosidase, pectato liase, cutinase, lipase, alfa-
15 amilase maltogênica, pectoliase ou expansina, ou uma
combinação destas; e em que o referido material de planta
compreende celulase, ligninase, beta-glicosidase,
hemicelulase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase,
pectato liase, cutinase, lipase, alfa-amilase maltogênica,
20 pectoliase ou expansina, ou uma combinação destas. Em uma
modalidade mais específica, o material de planta inclui
pelo menos dois dos seguintes: um primeiro genoma do
cloroplasto ou segmento do genoma que possui um gene
heterólogo que codifica celulase, um segundo genoma do
25 cloroplasto ou segmento do genoma que possui um gene
heterólogo que codifica ligninase, um terceiro genoma do
cloroplasto ou segmento do genoma que possui um gene
heterólogo que codifica beta-glicosidase; um quarto genoma
do cloroplasto ou segmento do genoma que possui um gene
30 heterólogo que codifica hemicelulase; um quinto genoma do

enzima ou combinação de enzimas representa mais de 0,1 por cento da proteína total da célula. Em uma modalidade ainda mais específica, a enzima ou combinação de enzimas representa mais de 1,0 por cento da proteína total na
5 célula.

Em uma modalidade adicional, a invenção pertence a uma composição derivada de planta que compreende celulase, ligninase, beta-glicosidase, hemicelulase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase, pectato liase, cutinase, lipase,
10 alfa-amilase maltogênica, pectoliase e/ou swolenina, e uma quantidade de rubisco. Em uma modalidade específica, a proporção de rubisco para enzima varia de 99:1 a 1:99.

Em uma modalidade adicional, a invenção pertence a cultivares comerciais que expressam recombinantemente um ou
15 mais compostos de degradação de plantas. Cultivares comerciais de tabaco como, por exemplo, sem limitação, LAMD e TN90, produzem substancialmente mais material de folha do que cultivares experimentais. No entanto, cultivares comerciais são mais sensíveis à introdução de genes
20 estranhos. Surpreendentemente, o inventor, através de experimentação e erro significativos, foi capaz de transfectar com sucesso células e induzir a expressão de compostos de degradação de plantas em cultivares comerciais.

25 Exemplos

Exemplo 1: Montagem de construções de expressão em cloroplasto

Para a integração de transgenes, foi usada uma região espaçadora ativa em termos de transcrição entre os genes
30 *trnI* e *trnA* (Fig. 1a). PCR resultou na amplificação de

vários genes de interesse (GOI), incluindo endoglucanase (celD), exoglucanase (celO) de DNA genômico de *Clostridium thermocellum*, lipase (lipY) de DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis*, pectato liases (pelA, pelB, pelD) e cutinase de *Fusarium solani*. Usando um novo método baseado em PCR, as sequências codificadoras de GOI, incluindo endoglucanases (egl1 e egI), swollenina (swol similar às expansinas), xilanase (xyn2), acetil xilana esterase (axel) e beta-glicosidase (bgl1), foram clonadas sem íntrons (que variam de 1-5) de DNA genômico de *Trichoderma reesei*. Vetores de transformação do cloroplasto de tabaco foram feitos com cada GOI (Fig. 1b). Todos os vetores de cloroplasto incluíam as sequências flanqueadoras 16S trnI/trnA para recombinação homóloga nas regiões de repetição invertidas do genoma do cloroplasto e o gene aadA que confere resistência à espectinomicina. O gene aadA foi dirigido pelo promotor constitutivo de óperon de rRNA com sítio de ligação de ribossomo GGAGG. O GOI foi dirigido pelo promotor psbA e UTR 5' a fim de obter níveis elevados de expressão. A UTR 3' localizada na extremidade 3' do GOI conferia estabilidade ao transcrito.

Exemplo 2: Geração e caracterização de tabaco transplastômico que expressa pectato liases (PelB & PelD) e endoglucanase (CelD)

Plantas transplastômicas de tabaco foram obtidas como descrito previamente^{28,29}. Análise *Southern-blot* foi realizada para confirmar a integração sítio-específica dos cassetes pLD-pelB, pLD-pelD e pLD-celD no genoma do cloroplasto e para determinar homoplasma. A digestão do DNA total da planta com *SmaI* de linhagens não transformadas

e transplastômicas gerou um fragmento de 4,014 kb não transformado (UT) ou um fragmento de 6,410 kb em pelB, 6,377 kb em pelD ou 7,498 kb em celD quando hibridizado com a sonda trnI-trnA marcada com [³²P], confirmando a integração sítio-específica dos transgenes na região espaçadora entre os genes trnI e trnA (Fig. 1c-e). Além disso, a ausência de um fragmento de 4,014 kb nas linhagens transplastômicas confirmou que a homoplasma foi obtida (dentro dos níveis de detecção). Os fenótipos de linhagens transplastômicas pareciam normais quando comparados com plantas não transformadas e eram férteis (produziram flores, sementes, Fig. 1f).

Imunoblots com anticorpos despertados contra PelA mostraram que PelB e PelD estão imunologicamente relacionados a PelA³⁰. Portanto, anticorpo de PelA foi usado para detectar a expressão de PelB e PelD, embora sua afinidade fosse variável em linhagens transplastômicas. Todas as linhagens transplastômicas mostraram expressão da proteína PelB ou PelD. Os níveis de expressão não se alteraram significativamente, correspondendo à sua atividade enzimática, dependendo do tempo de colheita, muito embora PelB e PelD sejam regulados pela luz (Fig. 2a,b). Isso pode ser por causa da afinidade variável entre epitopos antigênicos do anticorpo de PelB, PelD e PelA. A concentração da enzima se alterou ligeiramente com a idade da folha e diminuía em folhas mais velhas (Fig. 2a,b).

Exemplo 3: Quantificação de pectato liases (PelB, PelD), e endoglucanase (CelD) em momentos diferentes da colheita e idade da folha

A atividade da enzima variou significativamente,

dependendo dos estágios do desenvolvimento e do momento da colheita da folha. A atividade enzimática máxima foi observada em folhas maduras de PelB, PelD e CelD, com atividade reduzida em folhas mais velhas (Fig. 2c,d). As
5 folhas maduras colhidas às 6 da tarde mostraram atividade máxima tanto em PelB quanto em PelD, enquanto CelD mostrou atividade máxima às 10 da noite (Fig. 2c,d). Isso pode ser causado pela estabilidade aumentada da endoglucanase contra proteases em extratos de planta. A atividade de cpCelD não
10 diminuiu significativamente em extratos brutos de plantas armazenados em temperatura ambiente, por mais de trinta dias (dados não mostrados).

A atividade enzimática de CelD foi calculada usando o reagente de DNS ³¹ de acordo com o protocolo de IUPAC ³². A
15 atividade específica de cpCelD usando substrato de CMC 2% era de 493 unidades/mg de proteína solúvel total (TSP) ou 100 mg de tecido de folha, em extratos brutos preparados a partir de folhas maduras colhidas às 10 da tarde. Usando o ensaio de glicose hexoquinase, que é altamente específico
20 para glicose, a atividade específica foi de 4,5 unidades/mg de TSP e 6,28 unidades/mg de TSP, quando avicel 5% e solução sigmacell, respectivamente, eram usados como substrato (em pH 6,0, 60°C). A enzima celulase comercial (*Trichoderma reesei*, EC 3.2.1.4, Sigma) gerou 4,2
25 unidades/mg e 3,43 unidades/mg de sólido para o mesmo substrato. As Figuras 2c e 2d mostram que aproximadamente 26 unidades, 32 unidades e 4.930 unidades de PelB, PelD e CelD foram obtidas por grama de peso fresco de folhas maduras colhidas às 6 da tarde ou 10 da tarde. Dessa forma,
30 2.048, 2.679 e 447.938 unidades de PelB, PelD e CelD podem

ser colhidas a partir de cada planta de tabaco (cultivar experimental, Petit Havana). Com 8.000 plantas de tabaco desenvolvidas em um acre de terra, 16, 21 e 3.584 milhões de unidades de PelB, PelD ou CelD podem ser obtidas por corte único (Tabela 1). Com base em três cortes de tabaco em um ano, até 49, 64 e 10.751 milhões de unidades de PelB, PelD ou CelD podem ser colhidas a cada ano. O cultivar comercial gera 40 toneladas métricas biomassa de folhas frescas, em contraste com 2,2 tons no cultivar experimental Petit Havana. Portanto, espera-se que o cultivar comercial gere rendimentos 18 vezes maiores do que o cultivar experimental.

Exemplo 4: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática de pectato liases (PelB e PelD) e endoglucanase (CelD)

Tanto extratos de planta quanto de *E. coli* mostraram atividade ótima a 2,5 mg/ml de PGA (Fig. 3a). Portanto, todos os estudos de caracterização de enzima foram realizados nessa concentração de substrato. Estudos de cinética realizados pela utilização de 4 µg de TSP, com concentrações crescentes de PGA (0-2,5 mg), sob condições de ensaio padronizadas, geraram valores de Km de 0,39 e 1,19 µg/ml em PelB de cloroplasto (cp) e *E. coli* (r), respectivamente, enquanto os valores para PelD de cloroplasto e *E. coli* foram de 0,50 e 1,29 µg/ml, respectivamente. Os valores de Vmax obtidos foram de 2,75, 3,19, 2,75 e 3,14 unidades/mg para cpPelB, rPelB, cpPelD e rPelD, respectivamente (Fig. 3a).

O extrato bruto (4-5 µg de TSP) de planta ou *E. coli* foi usado para estudar o efeito do pH e da temperatura

sobre a atividade das enzimas. A temperatura ótima para a pectato liase de *E. coli* e cloroplasto derivada sob as condições de ensaio padronizadas foi de 40°C, e o pH ótimo foi de 8,0. As pectato liases derivadas de plantas mostraram um pH ótimo de 6,0 na presença de 1 mM de CaCl₂. Os extratos brutos de *E. coli* mostraram um pH ótimo de 8,0, independentemente da presença ou ausência de CaCl₂ na reação (Fig. 3b,c). O aumento da temperatura teve um efeito mínimo sobre a atividade de pectato liases derivadas de plantas, enquanto a enzima de *E. coli* mostrou atividade comparativamente menor em temperaturas mais elevadas (Fig. 3 d,e). Essas diferenças nas propriedades da enzima de dois hospedeiros diferentes podem ser causadas por seu enovelamento. Essa possibilidade era apoiada pela observação de que foi possível detectar a enzima de *E. coli* com anticorpo com tag HIS, mas não a enzima do cloroplasto (dados não mostrados). É sabido que proteínas estranhas formam ligações dissulfeto em cloroplastos ³³⁻³⁵, mas não em *E. coli*, quando expressas no citoplasma. As enzimas PelB e PelD possuem um número semelhante (12 ou 14) de cisteínas que poderiam formar ligações dissulfeto ³⁰.

A atividade de CpCelD com CMC 2% foi medida em pHs e temperaturas diferentes. A cpCelD mostrou pH ótimo entre pH 5,0 e pH 7,0 (Fig. 3f), enquanto a enzima de *E. coli* teve um pH ótimo de 6,5. A temperatura ótima foi entre 50-60°C para *E. coli* e 50-70°C para enzima de planta (Fig. 3g). CelD de *Clostridium thermocellum* é estruturalmente conhecida por ter afinidade por íons CaCl₂ e também fornecia termoestabilidade ³⁶. Embora 10 mM de CaCl₂ aumentassem a atividade de CelD em CMC 2% até 2 vezes no

extrato bruto de *E. coli*, isso não era evidente na CelD do extrato bruto de cloroplasto durante período inicial de incubação. Isso pode ser causado pela concentração ótima de íon cálcio presente em células de plantas. No entanto, 5 CaCl_2 com 20 μg de BSA gerou uma atividade aumentada em 5 vezes ao final da incubação de 24 horas para extrato bruto de cpCelD (Fig. 3h).

Exemplo 5: CelD, PelB e PelD de *E. coli* vs. de cloroplasto

O extrato bruto de *E. coli* contendo enzima CelD 10 mostrou diminuição da atividade enzimática quando a mistura de reação continha mais de 10 μg de TSP, em que os extratos brutos de plantas contendo CelD liberaram mais açúcar redutor com concentrações crescentes de proteína (Fig. 4a). A atividade de CelD expressa em cloroplasto foi saturada 15 (em CMC 2%) a 150 μg de TSP (Fig. 4a, detalhe) e não houve diminuição da atividade enzimática de CelD do cloroplasto em até 500 μg de TSP, como determinado pelo ensaio do ponto final. Esses resultados mostram que extratos de plantas brutos contendo cpCelD podem ser usados diretamente para 20 degradação de biomassa, sem qualquer necessidade de purificação, enquanto extratos de *E. coli* provavelmente contêm inibidores de endoglucanase. Similarmente, em concentrações maiores de proteína, rPelB e rPelD expressas por *E. coli* mostraram atividade de pectato liase reduzida, 25 enquanto cpPelB ou cpPelD continuaram a aumentar a atividade até 600 μg de TSP (Fig. 4b). Podem existir inibidores de pectato liase em extratos de *E. coli*, que não estão presentes em extratos brutos de plantas. Esse achado é potencialmente de alto significado prático, pois o uso de 30 extratos brutos elimina a necessidade de purificação de

equivalentes de glicose com papel de filtro (exceto rEg1) foi testado em substrato de madeira processada. Após hidrólise por 24 horas, 31% da hidrólise total foram observadas com esse coquetel (**Fig. 5b, barra 1**). Um coquetel de enzimas de endoxilanase e acetil xilana esterase mostrou 41% de hidrólise total (**Fig. 5b, barra 2**). Quando esses dois coquetéis foram combinados juntos, a hidrólise aumentou até 88% (**Fig. 5b, barra 3**). Quando o substrato de madeira processada primeiro foi tratado com pectato liases, seguido pela adição do coquetel de enzimas na barra 3, a hidrólise global foi aumentada ainda mais, com liberação de até 275 µg de glicose após incubação por 36 horas (**Fig. 5b, barra 4**). A adição de extratos de enzima de cutinase e lipase (ambos com atividade de lipase) não teve um efeito significativo sobre a liberação de açúcares fermentáveis (dados não mostrados). O coquetel de enzimas Novozyme 188 não gerou quaisquer equivalentes de glicose detectáveis a partir da madeira processada, enquanto Celluclast 1.5L gerou 10% mais do que o coquetel de extrato bruto, com unidades equivalentes de enzima com base na hidrólise de CMC.

De acordo com uma modalidade, a invenção pertence a um método para a digestão de uma amostra de biomassa à base de madeira que compreende a obtenção de um material de planta que compreende endoxilanase ou acetil xilana esterase, ou uma combinação destas, que foi expressa em uma planta da qual todo ou uma porção do referido material de planta é derivada; e mistura do referido material de planta com a referida amostra de biomassa à base de madeira. O método dessa modalidade pode ainda incluir a mistura com a amostra

de biomassa à base de madeira, antes ou simultânea à mistura com o material de planta de endoxilanase e/ou acetil xilana esterase, um material de planta que compreende uma pectato liase que foi expresso em uma planta da qual todo ou uma porção do referido material de planta é derivada. O material de planta pode compreender rubisco.

Outra modalidade pertence a um coquetel de enzimas de degradação de plantas útil na digestão de uma amostra de biomassa à base de madeira que compreende celulase, beta-glicosidase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase, pectina liase, swolenina ou pectato liase, ou uma combinação destas, expressas em uma planta, opcionalmente com uma quantidade de rubisco.

Exemplo 8: Coquetel de enzimas para hidrólise de resíduos de cítricos

O coquetel de enzimas de endoglucanase (cpCelD), exoglucanase, swolenina e beta-glicosidase liberou até 24% de hidrólise total com casca de cítricos (**Fig. 5c, barra 1**). Quando a casca de cítricos foi tratada com pectato liases (cpPelB, cpPelD e rPelA), a hidrólise foi duplicada (**Fig. 5c, barra 2**). Pectato liases contribuirão para até 47% de hidrólise total nesse coquetel, por causa do alto teor de pectina (23%) na casca de cítricos ⁴¹. A adição de endoxilanase, acetil xilana esterase, cutinase e lipase a ambos esses coquetéis liberou até 360 µg/ml de equivalentes de glicose de 100 mg de casca de cítricos moída após um período de incubação de 24 horas (**Fig. 5c, barra 3**). Enzimas como cutinase e lipase podem ter hidrolisado corpos oleosos presentes na casca de cítricos, fornecendo maior acesso às endoglucanase, endoxilanase e pectato liases para

uma hidrólise eficiente da casca de cítricos. O coquetel de enzimas Novozyme 188 gerou 11% mais equivalentes de glicose com casca de cítricos, enquanto Celluclast 1.5L gerou 137% mais do que o coquetel de extrato bruto com unidades de
 5 enzima equivalentes com base na hidrólise de CMC.

De acordo com uma modalidade, a invenção pertence a um método para a digestão de uma amostra de biomassa de cítricos que compreende a obtenção de um material de planta que compreende celulase, beta-glicosidase, xilanase, alfa-
 10 amilase, amiloglicosidase, pectina liase ou pectato liase, ou uma combinação destas, que foi expressa em uma planta da qual todo ou uma porção do referido material de planta é derivada; e mistura do referido material de planta com a referida amostra de biomassa de cítricos.

15 Outra modalidade pertence a um coquetel de enzimas de degradação de plantas útil na digestão de uma amostra de biomassa de cítricos que compreende celulase, beta-glicosidase, xilanase, alfa-amilase, amiloglicosidase, pectina liase, swolenina ou pectato liase, ou uma
 20 combinação destas, expressas em uma planta, opcionalmente com uma quantidade de rubisco.

Métodos relacionados aos Exemplos 1-8

Isolamento de genes e construção de vetores de transformação de plastídio

25 DNA genômico de *Clostridium thermocellum* e *Trichoderma reesei* foi obtido de ATCC e usado como modelo para a amplificação de diferentes genes. Foram designados iniciadores gene-específicos usando um iniciador direto (forward) contendo um sítio *NdeI* e um iniciador reverso
 30 contendo um sítio *XbaI* para clonagem no vetor pLD para os

genes *celD*, *celO* e *lipY*. A região madura de genes de
 celulose *celD* (X04584) e *celO* (AJ275975) foi amplificada a
 partir de DNA genômico de *Clostridium thermocellum*. *LipY*
 (NC_000962) foi amplificado a partir do DNA genômico de
 5 *Mycobacterium tuberculosis*. Foram designados iniciadores
 superpostos para a amplificação de vários éxons de *egl1*
 (M15665), *egI* (AB003694), *swol* (AJ245918), *axe1* (Z69256),
xyn2 (X69574) e *bgl1* (U09580) a partir do DNA genômico de
Trichoderma reesei usando um novo método. O cDNA de
 10 comprimento total desses genes foi amplificado a partir de
 éxons diferentes por um novo método baseado em PCR usando o
 iniciador direto do primeiro éxon e reverso do último éxon
 contendo um sítio *NdeI* e sítio *XbaI*, respectivamente. Os
 genes de pectato liase *pelA*, *pelB* e *pelD* de *Fusarium solani*
 15 com sítios de restrição similares foram amplificados usando
 iniciadores gene-específicos de pHILD2A, pHILD2B ³⁰ e
 pHILD2D ⁴⁵, respectivamente. Uma estratégia similar foi
 usada para amplificar o gene de cutinase ⁴⁶ a partir do
 clone recombinante de *Fusarium solani*. Todos os produtos de
 20 comprimento total amplificados foram ligados ao vetor pPCR
 Blunt II Topo (Invitrogen) e foram submetidos ao
 sequenciamento de DNA (Genewiz). Cada gene clonado no vetor
 Topo foi digerido com *NdeI/XbaI* e inserido no vetor pLD
 17,47 para fazer um vetor de expressão de tabaco em
 25 cloroplasto.

Regeneração de plantas transplastômicas e avaliação da integração do transgene por PCR e Southern-blot

Nicotiana tabacum var. Petite Havana foi desenvolvida
 assepticamente em meio de ágar de Murashige e Skoog (MS)
 30 sem hormônios contendo 30 g/l de sacarose. Folhas jovens

estéreis de plantas nos estágios de 4-6 folhas foram bombardeadas usando partículas de ouro revestidas com vetor pLD-PelB, pLD-PelD e pLD-CelD, e as plantas transplastômicas foram regeneradas como descrito previamente^{28,29}. O DNA genômico da planta foi isolado usando o mini kit de planta Qiagen DNeasy a partir de folhas. A análise por PCR foi realizada para confirmar a integração do transgene nas regiões de repetição invertidas do genoma do cloroplasto usando dois conjuntos de iniciadores 3P/3M e 5P/2M, respectivamente¹⁷. A reação de PCR foi realizada como descrito previamente^{17,29}. As folhas dos brotos PCR-positivos foram novamente cortadas em pequenos pedaços e transferidas em meio RMOP (meio de regeneração de plantas) contendo 500 mg/l de espectinomicina para outra rodada de seleção, e subsequentemente movidas para meio MSO (sais MS sem vitaminas e hormônios de crescimento) contendo 500 mg/l de espectinomicina para outra rodada de seleção para gerar linhagens homoplásmicas. Análise *Southern-blot* foi realizada para confirmar a homoplasma de acordo com o protocolo do lab⁴⁸. Resumidamente, o DNA genômico total de planta (1-2 µg) isolado de folhas foi digerido com *Sma*I e hibridizado com sonda da sequência flanqueadora de cloroplasto marcada com ³²P α[dCTP] (0,81 kb) contendo os genes *trnI-trnA*. A hibridização foi realizada pela utilização da solução e do protocolo de hibridização Stratagene QUICK-HYB.

Análise imunoblot

Aproximadamente 100 mg de folhas foram moídos em nitrogênio líquido e usados para análise *imunoblot*, como

descrito previamente ⁴⁸. A concentração de proteína foi determinada pelo kit de reagente de ensaio de proteína de Bradford (Bio-Rad). Quantidades iguais de proteína solúvel total foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma
 5 membrana de nitrocelulose. A expressão de proteína transgênica foi detectada usando soro policlonal despertado contra PelA em coelhos.

Preparação enzimática de *E. coli* (bruta)

E. coli cepa (XL-10 gold) que abriga a expressão em
 10 vetores de cloroplasto que expressam rCelD, rEg1 (EC 3.2.1.4), rCelO (EC 3.2.1.91), rXyn2 (EC 3.2.1.8), rAxel (EC 3.1.1.72), rBgl1 (EC 3.2.1.21), rCutinase (EC 3.1.1.74), rLipY (lipase, EC 3.1.1.3), rPelA, rPelB, rPelD (EC 4.2.2.2) ou rSwol foi desenvolvida de um dia para o
 15 outro a 37°C. As células foram coletadas a 4°C e sonificadas quatro vezes com pulsos de 30 s no tampão adequado (50 mM de tampão de acetato de sódio com pH 5,5 para CelD, Eg1, CelO, Swol, Xyn2, Axel, Bgl1, 100 mM de Tris-Cl com pH 7,0 para cutinase, lipase, PelA, PelB e
 20 PelD) contendo coquetel inibidor de protease (Roche) e azida de sódio (0,02%). O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos e a concentração de proteína foi determinada.

Preparação enzimática a partir de material de folha 25 transplastômica de tabaco

Folhas verdes frescas foram coletadas e moídas em nitrogênio líquido. A proteína solúvel total foi extraída em 50 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5,5 para cpCelD, cpXyn2, ou 100 mM Tris-Cl tampão, pH 7,0 para PelD e PelB.
 30 Todos os tampões continham coquetel inibidor de protease

(Roche) e azida de sódio (0,02%). A proteína solúvel total foi filtrada usando um filtro de seringa de 0,22 µm. A concentração de proteína (mg/ml) em TSP foi determinada usando o método de Bradford.

5 Ensaaios enzimáticos para pectato liase B e pectato liase D

Pectato liases B e D foram avaliadas espectrofotometricamente por medida do aumento em $A_{235}^{30,49,50}$. As cinéticas das pectato liases B e D foram
10 estudadas para otimizar a concentração de substrato (0-2,5 mg) sob concentrações idênticas de proteína e cofator. As misturas de reação continham 1 ml de 50 mM de tampão de Tris-HCl (pH 8,0) com 1 mM de CaCl_2 (recém-preparado), 1 ml de 0,0-2,5 mg/ml de poligalacturonato de sódio (Sigma) e
15 0,5 ml de solução de enzima adequadamente diluída. As medidas foram realizadas a 40°C. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 µmol de produto por min com um coeficiente de extinção molar de $4.600 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os estudos da cinética foram realizados
20 em 50 mM de tampão de Tris-HCl, pH 8,0 a 40°C. Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) foram calculados usando regressão não linear com o uso do software Graphpad Prism 5.0. As inclinações iniciais de cada concentração de substrato foram calculadas, em que a velocidade
25 (unidades/mg/min) foi definida através da liberação de ácido galacturônico não saturado. A otimização da temperatura para atividade de pectato liase B e D foi realizada em 50 mM de tampão de Tris-HCl, pH 8,0, em diferentes temperaturas que variam de 30°C a 70°C. Em cada
30 caso, o substrato foi pré-incubado na temperatura desejada

por min. A fim de estudar a estabilidade térmica da enzima, amostras tamponadas de enzima foram incubadas por um período de tempo fixo em diferentes temperaturas.

O pH ótimo da pectato liase B e D foi medido a 40°C usando diferentes tampões com pH variando de 6 a 10, com a mesma potência iônica. A estabilidade do extrato bruto da enzima foi otimizada por incubação da enzima nos diferentes pHs. A influência do cofator CaCl_2 sobre a atividade da pectato liase foi estudada por realização das reações em sua presença e ausência em diferentes pHs e temperaturas.

Ensaio enzimático para CelD e coquetel comercial (Celluclast 1.5L e Novozyme 188)

A atividade enzimática de celulase de cpCelD foi determinada por incubação do extrato bruto em carboximetilcelulose 2%, avicel e sigmacell (Sigma) como substrato de acordo com as recomendações IUPAC ³² em 50 mM de tampão de acetato de sódio pH 6,0, e incubada a 60°C por 30 minutos para CMC e 2 horas para avicel e sigmacell. As unidades de enzima de coquetéis comerciais Celluclast 1.5L e Novozyme 188 foram determinadas usando CMC 2%, sob condições de ensaio idênticas. A quantidade de açúcar redutor foi determinada usando ácido 3,5-dinitrossalicílico ³¹. D-glicose e ácido D-galacturônico foram usados como padrão para medir a liberação de equivalentes de glicose e moléculas de ácido galacturônico não saturado. CMC (2%) foi usado na determinação do perfil de atividade de pH e temperatura de cpCelD. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que liberava 1 μmol de equivalente de glicose por minuto/ml. O cálculo de unidade de celulase para avicel e sigmacell foi baseado no método

de glicose hexoquinase de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma).

Hidrólise enzimática de papel de filtro, madeira processada e casca de cítricos

5 Ensaios enzimáticos foram realizados com um componente enzimático ou como coquetel em papel de filtro, madeira processada e casca de laranja e o açúcar redutor liberado foi determinado usando o método de DNS. Casca de laranja preparada a partir da fruta laranja Valência (*Citrus*
10 *sinensis* cv Valencia) foi seca ao ar de um dia para o outro e moída em nitrogênio líquido. Casca de laranja Valência moída e biomassa de madeira pré-tratada foram lavadas várias vezes em água destilada até que nenhum açúcar redutor fosse detectado por reagente de DNS, bem como pelo
15 método de glicose hexoquinase.

Para digestão enzimática, foram usados 50-200 mg de amostra de madeira processada ou casca de laranja moída. Extratos brutos contendo enzimas de *E. coli* e de plantas foram usados no coquetel para hidrólise. O açúcar redutor
20 do produto final foi determinado usando o reagente de DNS ³¹ e D-glicose como padrão. Ampicilina e canamicina a 100 µg/ml foram adicionadas para evitar qualquer crescimento microbiano durante as longas durações da hidrólise enzimática. Coquetéis de enzimas comerciais Celluclast 1.5L
25 e Novozyme 188 foram testados quanto à hidrólise de casca de cítricos e madeira processada nas mesmas condições de ensaio usadas para os coquetéis de enzimas de extratos brutos. Unidades de enzima de Celluclast 1.5L e Novozyme 188 usadas para os ensaios de hidrólise eram equivalentes
30 às unidades de enzima cpCelD (com base na hidrólise de CMC)

presentes em coquetéis de extratos brutos. Em todos os experimentos, os ensaios de controle continham substrato sem enzima ou enzima sem substrato. Todos os experimentos e ensaios foram realizados em triplicata.

Os inventores usaram sequências codificadoras de genomas bacterianos ou fúngicos para criar vetores de cloroplasto. Um novo método baseado em PCR foi usado para clonar ORFs sem íntrons de DNA genômico fúngico. O sistema de expressão de *E. coli* foi usado para avaliar a funcionalidade de cada enzima independentemente ou sua eficácia em coquetéis de enzimas antes de criar linhagens transgênicas; enzimas de origem fúngica eram ativas sem qualquer necessidade de modificações pós-tradução (ligações dissulfeto ou glicosilação). Os fenótipos de linhagens transplastômicas homoplásmicas eram normais e produziram flores e sementes. Com base em três cortes de tabaco em um ano ^{49,64}, 10.751 milhões de unidades de atividade de pectato liase e endoglucanase podem ser obtidas a cada ano em um cultivar experimental. Esse rendimento poderia ser aumentado 18 vezes quando essas enzimas são produzidas em cultivares comerciais. Com base no "Economic Research Service" do USDA, o custo de produção de tabaco Burley em 2004 foi de U\$ 3.981 por acre. Como a maioria das enzimas para a hidrólise de biomassa de planta é ativa em temperaturas mais elevadas, é factível colher folhas e secá-las ao sol, como relatado previamente para xilanase derivada de cloroplasto ²⁵. Com base na atividade enzimática observada em extratos brutos de plantas nesse estudo, não há necessidade de purificação. Portanto, excluindo o custo de processamento, as enzimas poderiam ser

.
. produzidas por apenas U\$ 0,008 para PelB, U\$ 0,006 para
. PelD por unidade de enzima (como definido na fonte
. comercial Megazyme). Isso é 925-1.233 vezes mais barato
5 comerciais atuais (Megazyme produzida por *C. japonicus*).
Embora essa comparação de custos ou rendimento possa não
ser a mesma para todas as enzimas derivadas de cloroplasto,
esse conceito fornece uma nova plataforma promissora para
coquetéis de enzimas baratos para a produção de açúcares
10 fermentáveis a partir de biomassa lignocelulósica.

Que seja do nosso conhecimento, esse é o primeiro
estudo que utiliza coquetéis de enzimas expressas em
plantas para hidrólise de biomassa lignocelulósica para a
produção de açúcares fermentáveis e comparação direta das
15 propriedades da enzima produzidas por meio de fermentação
ou em plantas, usando genes e sequências reguladoras
idênticas. A maioria dos estudos sobre hidrólise enzimática
em substratos naturais como, por exemplo, madeira pré-
tratada, forragem de milho ou palha de trigo, utilizou
20 enzimas disponíveis comercialmente ^{3,42} ou enzimas
recombinantes purificadas reforçadas com enzimas comerciais
purificadas ^{40,43}. A comparação precisa de coquetéis de
enzimas de extratos brutos com coquetéis comerciais não é
possível, já que suas composições de enzimas não são
25 conhecidas. Portanto, unidades de enzima equivalentes com
base na hidrólise de CMC foram usadas como uma base para
comparação geral. ACCELLERASE TM 1000 (Genencor) não estava
disponível para esse estudo, em função de acordos
institucionais necessários. O coquetel de enzimas
30 purificadas Novozyme 188 não gerou equivalentes de glicose

detectáveis a partir de madeira processada, e 11% mais equivalentes de glicose com casca de cítricos, enquanto Celluclast 1.5L gerou 10% e 137% mais com ambos os substratos de biomassa do que o coquetel de extrato bruto, com unidades de enzima equivalentes com base na hidrólise de CMC. Não é surpreendente que os coquetéis de extrato bruto tenham tido um desempenho igual ou melhor do que os coquetéis de enzimas purificadas, pois esses últimos são produzidos por fermentação submersa de cepas fúngicas selecionadas que secretam várias enzimas, simultaneamente. De acordo com Novozymes, é necessário um design cuidadoso de uma combinação de enzimas de componente único para utilização racional desses coquetéis de enzimas ⁴⁴.

Exemplo 9: Expressão de enzimas de degradação de plantas

Os ensinamentos apresentados nos Exemplos 1-8 podem ser adaptados para a preparação de cassetes de expressão do gene heterólogo, construção de vetores de transformação; transformação de cloroplastos e expressão em cloroplasto de qualquer uma em uma numerosa lista de enzimas que os inventores identificaram que serão úteis na degradação de biomassa de fontes de plantas. Além disso, os Requerentes referem-se às Publicações de Patente U.S. 20070124830 e 20060117412 para técnicas de transformação de cloroplasto e expressão de proteínas.

Uma lista não limitante de enzimas exemplares inclui as seguintes na Tabela I:

Tabela I

GOI (Genes de interesse)

1. Endoglucanases

- a) celD (*Clostridium thermocellum*)
- b) egI (*Trichoderma reesei*)
- c) egII (*Trichoderma reesei*)

2. Exoglucanase

- a) celO (*Clostridium thermocellum*)

3. Lipase

- a) lipY (*Mycobacterium tuberculosis*)

4. Pectato liases

- a) pelA (*Fusarium solani*)
- b) pelB (*Fusarium solani*)
- c) pelD (*Fusarium solani*)

5. Cutinase

- a) cut (*Fusarium solani*)

6. Swollenina similar às expansinas

- a) swol (*Trichoderma reesei*)

7. Xilanase

- a) xyn2 (*Trichoderma reesei*)

8. Acetil xilana esterase

- a) axel (*Trichoderma reesei*)

9. Beta-glicosidase

- a) bgl1 (*Trichoderma reesei*)

10. Mananase

- a) man1 (*Trichoderma reesei*)

11. Arabinofuranosidase

- a) abf1 (*Trichoderma reesei*)

12. Lignina peroxidase

- a) lipJ (*Mycobacterium tuberculosis*)

Além da lista acima, as tabelas anexadas II-VII

apresentam uma lista de diferentes enzimas que podem ser usadas em conjunto com modalidades da invenção. Os N^{os} EC são designações reconhecidas (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> e NC-IUBMB) que 5 definem cada uma das enzimas com referências cruzadas para sequências de polipeptídeos relevantes e sequências de polinucleotídeos codificadoras. Os N^{os} de acesso pertencem às identificações de sequências no Genbank (uma letra seguida por cinco dígitos, por exemplo, M12345) ou o 10 formato RefSeq (duas letras seguidas por uma sub-barra e seis dígitos, por exemplo, NT_123456). Cada uma das sequências e N^{os} de acesso relacionados estão armazenados na divisão "Corenucleotide" do sistema de base de dados GenBank. Um N^o de acesso listado nas Tabelas II-VII para um 15 gene específico pode ser facilmente encontrado por inserção do número de acesso no campo de pesquisa do sistema Entrez encontrado em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>). Em uma modalidade específica, as sequências dos N^{os} de acesso listadas especificamente nas tabelas II-VI incluem 20 aquelas em seu estado original ou como revisadas/atualizadas no sistema Genbank em 28 de fevereiro de 2008. Em outras modalidades, é contemplado que as sequências podem ser revisadas/atualizadas depois de 28 de fevereiro de 2008, mas de outro modo reconhecidas pela 25 técnica como a sequência mais precisa do N^o de acesso comparada com a sequência armazenada antes de 28 de fevereiro de 2008. Nessas outras modalidades, sequências revisadas, mas reconhecidas como a sequência verdadeira e que possui uma identidade de sequência de pelo menos 95% 30 para a sequência armazenada na base de dados antes de 28 de

fevereiro de 2008, devem ser consideradas como a sequência para o N° de acesso relevante.

Os requerentes também incorporam por referência o arquivo de texto ASCII intitulado 10669-034segid depositado com o presente pedido. Esse arquivo de texto contém informação de sequência do N°s de acesso listados nas Tabelas II-VII.

Além disso, nucleotídeos e peptídeos que possuem identidade substancial para as sequências de nucleotídeos e aminoácidos com relação às enzimas de degradação de plantas (por exemplo, aquelas fornecidas nas tabelas II-VII) usadas em conjunto com a presente invenção também podem ser empregados em modalidades preferidas. Aqui, "identidade substancial" significa que duas sequências, quando otimamente alinhadas como, por exemplo, pelos programas GAP ou BESTFIT (peptídeos) usando ponderações de (gap) padronizadas, ou como medido pelos algoritmos computacionais BLASTX ou BLASTP, compartilham pelo menos 50%, preferivelmente 75% e, principalmente, 95% de identidade de sequência. De preferência, as posições de resíduo que não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservadoras. Por exemplo, é provável que a substituição de aminoácidos que possuem propriedades químicas similares como, por exemplo, carga ou polaridade, não afete as propriedades de uma proteína. Exemplos não limitantes incluem glutamina para asparagina ou ácido glutâmico para ácido aspártico.

O termo "variante", como aqui usado, refere-se às sequências de nucleotídeos e polipeptídeos em que a sequência de nucleotídeos ou aminoácidos exibe identidade

substancial com a sequência de nucleotídeos ou aminoácidos do Anexo B, preferivelmente 75% de identidade de sequência e, principalmente, 90-95% de identidade de sequência para as sequências da presente invenção: desde que a referida variante possua uma atividade biológica como aqui definida. A variante pode surgir por modificação da sequência de nucleotídeos ou aminoácidos nativa por modificações como, por exemplo, inserção, substituição ou eliminação de um ou mais nucleotídeos ou aminoácidos, ou ela pode ser uma variante de ocorrência natural. O termo "variante" também inclui sequências homólogas que hibridizam para as sequências da invenção sob condições de hibridização padronizadas ou, preferivelmente, rigorosas, familiares àqueles habilitados na técnica. Exemplos do procedimento de hibridização *in situ* tipicamente usado são descritos em Tisdall e cols., 1999; Juengel e cols., 2000. Quando for desejada uma variante desse tipo, a sequência de nucleotídeos do DNA nativo será alterada adequadamente. Essa alteração pode ser feita por meio da síntese eletiva do DNA ou por modificação do DNA nativo, por exemplo, por mutagênese sítio-específica ou por cassete. De preferência, quando porções de cDNA ou DNA genômico exigirem modificações da sequência, será empregada a mutagênese sítio-específica dirigida por iniciador, usando metodologias padronizadas na técnica.

Em modalidades específicas, uma variante de um polipeptídeo é aquela que possui pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da sequência de comprimento total de uma sequência nativa das enzimas de degradação de plantas

fornecidas no arquivo ASCII anexado 10669-034SEDID. Esses polipeptídeos variantes incluem, por exemplo, polipeptídeos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados, ou eliminados, no terminal N e/ou C, bem como dentro de um ou mais domínios internos, da sequência de aminoácidos de comprimento total. Fragmentos dos peptídeos também são contemplados. Normalmente, um polipeptídeo variante terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 94%

de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de aminoácidos e ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de aminoácidos com um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucléico mostrada no Anexo B ou um fragmento especificado desta. Normalmente, polipeptídeos variantes possuem pelo menos cerca de 10 aminoácidos de comprimento, frequentemente pelo menos cerca de 20 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 30 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 40 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 50 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 60 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 70 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 80 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 90 aminoácidos de comprimento, mais frequentemente pelo menos cerca de 100 aminoácidos de comprimento, ou mais.

O "rigor" de reações de hibridização é facilmente determinável por aqueles habilitados na técnica, e geralmente é um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, da temperatura de lavagem e da concentração de sal. Em geral, sondas mais longas exigem temperaturas

maiores para anelamento adequado, enquanto sondas mais curtas precisam de temperaturas menores. A hibridização geralmente depende da habilidade do DNA desnaturado para reanelar quando fitas complementares estão presentes em um ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de identidade desejado entre a sonda e a sequência hibridizável, maior a temperatura relativa que pode ser usada. Como resultado, por conseguinte, temperaturas relativas maiores tenderiam a tornar as condições de reação mais rigorosas, enquanto temperaturas menores tenderia, a tornar menos rigorosas. Para detalhes e explicações adicionais sobre o rigor das reações de hibridização, veja Ausubel e cols., "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições rigorosas" ou "condições de alto rigor", como aqui definidas, são identificadas como aquelas que: (1) empregam baixa potência iônica e alta temperatura para lavagem, 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/dodecil sulfato de sódio 0,1% a 50°C; (2) empregam durante a hibridização um agente desnaturante, formamida 50% (v/v) com albumina sérica bovina 0,1%/ Ficoll 0,1%/polivinilpirrolidona 0,1%/50 mM de tampão de fosfato de sódio em pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42°C; ou (3) empregam formamida 50%, 5X SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), pirofosfato de sódio 0,1%, solução de Denhardt 5 vezes, DNA de esperma de salmão sonificado (50 µg/ml), SDS 0,1% e sulfato de dextrana 10% a 42°C, com lavagens a 42°C em 0,2X SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida 50% a 55°C, seguidas

por uma lavagem de alto rigor que consiste em 0.1X SSC contendo EDTA a 55°C.

"Condições de rigor moderado" são identificadas como descrito por Sambrook e cols., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Nova York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem o uso de solução de lavagem e condições de hibridização (por exemplo, temperatura, potência iônica e % de SDS) menos rigorosas do que aquelas descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente rigorosas é incubação de um dia para o outro a 37°C em uma solução que compreende: formamida 20%, 5X SSC (150 mM de NaCl, 15 mM citrato tri-sódico), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), 5x solução de Denhardt, sulfato de dextrana 10% e 20 mg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado cisalhado, seguido por lavagem dos filtros em 1X SSC em torno de 37-50°C. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão como ajustar a temperatura, potência iônica etc. como necessário para acomodar fatores como, por exemplo, o comprimento da sonda, e semelhantes.

Tipicamente, para condições de hibridização rigorosas, deve ser escolhida uma combinação de temperatura e concentração de sal que seja aproximadamente 12-20°C abaixo da T_m calculada do híbrido sob estudo. A T_m de um híbrido entre um polinucleotídeo que possui uma sequência de nucleotídeos mostrada no ID. DE SEQ. N°: 1, ou o complemento desta, e um sequência de polinucleotídeos que é pelo menos cerca de 50, preferivelmente cerca de 75, 90, 96 ou 98% idêntica a uma daquelas sequências de nucleotídeos, que pode ser calculada, por exemplo, com o uso da equação de Bolton e McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48,

1.390 (1962):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} - 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - 600/l)$$

em que l = o comprimento do híbrido em pares de bases.

5 Em uma modalidade específica, condições de lavagem rigorosas incluem, por exemplo, 4 X SSC a 65°C, ou formamida 50%, 4 X SSC a 42°C ou 0,5 X SSC, SDS 0,1% a 65°C. Condições de lavagem altamente rigorosas incluem, por exemplo, 0,2 X SSC a 65°C.

10 Exemplo 10: Otimização de coquetéis de enzimas
recombinantes expressas

Tendo sido demonstrado por vários exemplos que enzimas de degradação de plantas podem ser expressas em plantas e bactérias, podem ser produzidos coquetéis de enzimas que
 15 são especialmente adaptados para a degradação de uma classe visada de biomassa. Os inventores descobriram que certas combinações de enzimas selecionadas são capazes de hidrolisar materiais de biomassa de forma sinérgica. Por exemplo, foi descoberto que duas ou mais enzimas de uma
 20 classe em particular funcionam sinergicamente para degradar material-alvo na biomassa para aumentar o rendimento obtido de açúcares fermentáveis. Com base na composição conhecida de uma amostra de biomassa-alvo, mais de uma enzima em uma classe em particular são incluídas no coquetel de
 25 degradação de plantas. Além disso, a quantidade de enzima de uma classe de enzima específica que sabidamente degrada um composto específico em uma amostra de biomassa está aumentada em relação à outra enzima no coquetel em função da proporção do composto específico/massa da amostra de
 30 biomassa. Informações gerais em relação às classes

exemplares de enzimas são discutidas abaixo no relacionamento como o tipo de substratos sobre os quais atuam. Equipados com os ensinamentos e técnicas aqui discutidos, aqueles habilitados na técnica são capazes de determinar coquetéis adequados para certa biomassa, e métodos pelos quais a sinergia das enzimas nos coquetéis pode ser determinada.

Ensaaios enzimáticos

A maioria dos ensaios enzimáticos foi determinada espectrofotometricamente por medida do aumento em $A_{235}^{30,47,48}$. As cinéticas enzimáticas foram estudadas para otimizar a concentração de substrato (0-2,5 mg) sob concentrações idênticas de proteína e cofator. As misturas de reação continham tampões, substratos e enzimas-padrão apropriados, quando comercialmente disponíveis. As medidas foram feitas em diferentes temperaturas e pHs. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de produto por min com coeficiente de extinção molar apropriado. Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) são calculados usando regressão não linear com utilização do software Graphpad Prism 5.0. As inclinações iniciais de cada concentração de substrato são calculadas, em que a velocidade (unidades/mg/min) é definida através da liberação do produto apropriado. A otimização da temperatura é determinada em tampões adequados com cofatores necessários, substratos em pH ótimo. A fim de estudar a estabilidade térmica de cada enzima, as amostras tamponadas de enzima são incubadas por períodos de tempo fixos em diferentes temperaturas. Similarmente, o pH ótimo de cada enzima é medido em temperaturas ótimas usando

diferente tampões com pH que varia de 6 a 10, com a mesma
potência iônica. A estabilidade do extrato bruto da enzima
é otimizada por incubação da enzima nos diferentes pHs. A
influência de vários cofatores para a atividade enzimática
5 ótima é estudada realizando-se as reações na presença ou
ausência de cada cofator, em diferentes pHs e temperaturas.

Endoglucanase, celobiohidrolase e beta-glicosidase:

A celulose é a fonte biológica renovável mais
abundante produzida na biosfera através de processo
10 fotossintético (aproximadamente 100 bilhões de toneladas
secas/ano) ⁴⁹⁻⁵¹. A biodegradação da celulose por celulasas
e celulosomas, produzidas por vários microorganismos,
representa um fluxo de carbono importante de depósitos
fixos de carbono para o CO₂ atmosférico, e estudos
15 demonstraram que o uso de produtos de origem biológica e
bioenergia podem obter zero de emissão líquida de dióxido
de carbono ^{52,53}. A celulose é um polímero de condensação
linear que consiste em D-anidroglicopiranoses unidos juntos
por ligações 3-1,4-glicosídicas com um grau de
20 polimerização (DP) de 100 a 20.000. Aproximadamente 30
moléculas individuais de celulose são montadas em unidades
maiores conhecidas como fibrilas elementares
(protofibrilas), que são compactadas em unidades maiores
denominadas microfibrilas, e essas, por sua vez, são
25 montadas em fibras de celulose grandes ^{54,55}. A degradação
da biomassa envolve a liberação de polissacarídeos de
cadeia longa, especificamente celulose e hemicelulose, e a
subsequente hidrólise desses polissacarídeos em seus
açúcares componentes com cadeia de 5 e 6 carbonos ¹⁵. Um
30 dos desafios tecnológicos mais importantes e difíceis é

superar a resistência de materiais lignocelulósicos naturais, que devem ser enzimaticamente hidrolisados para a produção de açúcares fermentáveis ^{2,7,8,56,52}.

O mecanismo de degradação de celulose envolve três classes de enzimas de celulase. Essas incluem endoglucanases ou 1,4- β -D-glucan-4-glicanohidrolases (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou 1,4- β -D-glicano celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), e β -glicosidase ou β -glicosídeo glicohidrolases (E.C. 3.2.1.21) ^{55,58,59}. As ações combinadas de endoglucanases e exoglucanases modificam a natureza cristalina da superfície da celulose ao longo do tempo, resultando em mudanças rápidas nas taxas de hidrólise ⁶⁰. O inventor percebeu que a ação simultânea dessa classe de enzima no substrato de celulose degrada completamente as ligações 3-1,4-glicosídicas intramoleculares de cadeias de celulose. Isso resulta na liberação de grandes quantidades de moléculas fermentáveis de glicose.

Endoglucanases (por exemplo, CelD, Egl): Endoglucanases cortam de forma aleatória em sítios internos amorfos na cadeia polissacarídica de celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos e, conseqüentemente, expõem novas extremidades da cadeia. *Exoglucanases* (por exemplo, CelO, Cbh2): Exoglucanases ou celobiohidrolases atuam no processamento das extremidades redutoras ou não redutoras das cadeias polissacarídicas da celulose, liberando glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolase) como produtos principais. Celobiohidrolases também podem atuar sobre a estrutura de celulose amorfa e microcristalina que possui extremidades expostas da cadeia de celulose. *β -Glicosidases* (por

exemplo, BglA, Bgl1): hidrolisam celobiose solúvel, além de moléculas de celodextrinas mais longas em glicose.

CelD, Egl1, EG1 (endoglucanases) e CelO (celobiohidrolase): Substrato: Carboxilmetilcelulose (2%)
 5 beta D-glicano (10 mg/ml), celulose microcristalina, Avicel, celulose Sigma (todas 50 mg/ml). São feitas pelo menos duas diluições para cada amostra de enzima investigada em 50 mM de tampão de acetato de sódio contendo 10 mM de CaCl₂ e 20 µg de BSA. No ensaio, uma diluição deve
 10 liberar ligeiramente mais e uma ligeiramente menos do que 0,5 mg (quantidade absoluta) de glicose. A amostra é incubada em temperatura apropriada por 30 minutos após adição de 0,5 ml de solução de substrato. Após incubação, 0,5 ml de DNS é adicionado a 0,5 ml da mistura de reação,
 15 seguido por fervura por exatamente 5 minutos em um banho-maria em ebulição juntamente com vazios de enzima e padrões de glicose. Após a fervura, 166 µl de sal de Rochelle 40% são adicionados e transferidos imediatamente para um banho-maria frio por, no máximo, 30 minutos. O tubo é misturado
 20 por inversão várias vezes de modo que a solução se separa do fundo do tubo a cada inversão. A mistura é medida a 575 nm em um espectrômetro. A absorbância é traduzida (corrigida, se necessário, por subtração do vazio) em produção de glicose durante a reação usando um gráfico de
 25 curva de glicose-padrão. A unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol por minuto ³².

Bgl1 (Trichoderma reesei): Ensaio de beta-glicosidase:

30 Substrato: celobiose, 2-15 mM em tampão de acetato de

sódio pH 4.8.

São feitas pelo menos duas diluições de cada amostra de enzima investigada. Uma diluição deve liberar ligeiramente mais e uma ligeiramente menos do que 1,0 mg (quantidade absoluta) de glicose na condições de reação. Adicionar 1,0 ml de diluição da enzima em tampão de acetato de sódio pH 4,8 a 1,0 ml de substrato de celobiose. Incubar a 50°C por 30-120 minutos. Interromper o ensaio por fervura em banho-maria por 5 minutos. Determinar a glicose liberada usando o método de glicose hexoquinase (Sigma). Uma unidade de enzima é definida como 1,0 μ mol de glicose liberado por minuto da celobiose. Substrato: 2-15 mM de para-nitrofenil D-glicosídeo em tampão de acetato de sódio pH 4,8. Adicionar 0,3 ml de solução de enzima diluída a 0,6 ml de 50 mM de tampão de acetato de sódio e 0,3 ml de para-nitrofenil D-glicosídeo. Realizar a reação a 50°C por 10 minutos. Interromper a reação com 1 M de Na_2CO_3 . Medir por espectrofotometria o p-nitrofenol liberado a 410 nm usando p-nitrofenol como padrão. Construir a curva de calibração para p-nitrofenol na faixa de concentração de 0,02-0,1 mM. A unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de p-nitrofenol por min por pNPG.

Xilanase

Endo-xilanases: A xilana é um dos componentes principais da fração de hemicelulose das paredes de células de plantas e é responsável por 20-30% de sua massa seca total. Diferentemente da celulose, o xilana é um polímero complexo que consiste em monômeros de xilose ligados em β -1,4 substituídos com cadeias laterais. A hidrólise do

calculada usando a fórmula-padrão ⁶⁴.

Cutinase:

Cutinase do fungo fitopatogênico *Fusarium solani* pisi é um exemplo de uma pequena éster carboxílico hidrolase que
5 liga propriedades funcionais entre lipases e esterases. A cutina, um poliéster composto por hidróxi e hidróxi epóxi ácidos graxos contendo 16 e 18 átomos de carbono, é o componente estrutural principal da barreira protetora que cobre a superfície das partes aéreas de plantas ^{65,66}. As
10 cutinases não apenas degradam polímeros de cutina, mas também uma grande variedade de triacilgliceróis de cadeia curta e longa é rapidamente hidrolisada. A enzima pertence à família de serina hidrolases que contêm a denominada dobra α/β -hidrolase ^{67,68}. A hidrólise de moléculas de
15 cutina, lipase e triacilgliceróis que estão presentes em grande quantidade na casca de resíduos de cítricos dá uma grande acessibilidade para enzimas como pectinases, celulasas e xilanases. Portanto, a cutinase é um componente enzimático importante na hidrólise enzimática da casca de
20 cítricos para a produção de biocombustível.

Ensaio de cutinase ^{67,69}: Substrato: p-nitrofenil butirato e p-nitrofenil palmitato (0,01% ou 10 mM). A enzima é extraída de plantas transplastômicas em 100 mM de tampão de Tris-HCl (pH 7,0) e Triton X-100 0,03% será
25 adicionado no momento do início do ensaio enzimático. As reações são realizadas por incubação por 10-15 min a 30°C em um tubo contendo 1 ml de substrato (100 mM Tris-HCl, pH 7, Triton X-100 0,03% e p-nitrofenol butirato 0,01% e várias quantidades de amostra de enzima (gelada). A
30 liberação de p-nitrofenol é medida a 405 nm usando p-

nitrofenol como padrão. A atividade de fundo é subtraída da leitura de absorção, se necessário. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade que degrada 1 μmol de substrato por minuto sob condições padronizadas.

Mananase:

A mananase é usada na indústria de papel e de polpa, para o branqueamento enzimático de polpa de madeira mole, na indústria de detergente como um reforço para a remoção de manchas, na indústria do café para hidrólise de manana de café para reduzir a viscosidade de extratos de café, na indústria de moagem de óleo para aumentar o fluxo de óleo ou gás, na extração de óleo da carne do coco, na indústria têxtil para o processamento de fibras celulósicas e na indústria de aves para aumentar o valor nutricional de rações para aves ⁷⁰.

Polissacarídeos da parede celular podem ser convertidos em açúcares fermentáveis por meio de hidrólise enzimática usando enzimas como, por exemplo, celulasas e hemicelulasas, e os açúcares fermentáveis assim obtidos podem ser usados para produzir etanol lignocelulósico. A mananase é uma hemicelulase. A hemicelulose é um grupo complexo de polímeros heterogêneos e representa uma das fontes principais de matéria orgânica renovável. Mananas são um dos principais grupos constituintes de hemicelulose e estão amplamente distribuídas em madeiras duras e madeiras mole, sementes de plantas leguminosas e no feijão. Hemiceluloses constituem até 25-30% do peso seco total da madeira. As hemiceluloses em madeiras mole são principalmente galactoglucomanana, contendo resíduos de

manose/glicose/galactose em uma proporção de 3:1:1 e glucomanana com resíduos de manose/glicose na proporção de 3:171. Mananases são endohidrolases que clivam aleatoriamente dentro da cadeia principal de 1,4- β -D manana de galactomanana, glucomanana, galactoglucomanana e manana. Mananases hidrolisam as ligações β -D-1,4 manopiranosídeo em β -1,4 mananas. Os produtos principais obtidos durante a hidrólise de mananas por β -mananases são manobiose e manotriose. Enzimas adicionais, por exemplo, β -glicosidases e α -galactosidases, são necessárias para remover açúcares da cadeia lateral que estão anexadas em vários pontos em mananas. Uma grande variedade de bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos sabidamente produzem mananase. Entre as bactérias, principalmente gram-positivas, incluindo várias espécies de *Bacillus* e de *Clostridia* e algumas cepas de bactérias gram-negativas, por exemplo, *Vibrio* e *Bacteroides*, também foram relatadas. O grupo de degradação de manana mais proeminente entre fungos pertence aos gêneros *Aspergillus*, *Agaricus*, *Trichoderma* e *Sclerotium* ⁷⁰.

O procedimento de ensaio para determinação da atividade de mananase envolve a incubação do extrato de enzima bruto com o substrato (galactomanana de goma de alfarroba como substrato). Após a reação enzimática, os açúcares redutores liberados são quantificados, e a atividade enzimática é medida. A goma de alfarroba (0,5%) será dissolvida em tampão de citrato (pH 5,3) e aquecida até ferver; essa mistura é usada como o substrato. O extrato de enzima bruto é incubado com o substrato a 50°C por 5 minutos. Os açúcares redutores liberados na reação enzimática são testados por adição de reagente de ácido

dinitro salicílico em ebulição por 5 min, resfriamento e medida da absorbância a 540 nm ⁷².

Outro método ensaio envolve galactomanana de alfarroba (0,2%) como substrato em tampão de acetato de sódio (pH 5).
5 O extrato de enzima bruto é incubado com o substrato a 40°C por 10 minutos. Os açúcares redutores liberados são medidos pelo método de Nelson-Somogyi, e a atividade enzimática é quantificada ⁷³. Em um ensaio de difusão em gel, placas de gel são preparadas por dissolução de goma de alfarroba
10 0,05% (p/v) em tampão de citrato fosfato (pH 5,0), juntamente com Phytagar. O extrato de enzima bruto é transferido para as placas de gel e incubado por 24 horas. Os géis serão corados pela utilização de vermelho Congo. As zonas clareadas (halos) nas placas indicavam atividade de
15 endo-beta-mananase ⁷⁴.

Arabinofuranosidase 1 (ABF1)

ABF1 demonstrou ter vários usos potenciais. L-arabinose é encontrada por muitos tecidos de plantas diferentes em pequenas quantidades, mas colocada
20 estrategicamente como grupos laterais. ABF1 facilita a degradação dessas cadeias laterais e o entrecruzamento dentro da parede celular para funcionar sinergicamente com outras enzimas como, por exemplo, hemicelulases. Isso pode aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis para a
25 produção de biocombustível a partir de biomassa ou polpa e a produção de papel. Essa enzima pode aumentar a digestibilidade de rações para animais de criação, tem sido usada na clarificação de sucos de fruta e pode ajudar na aromatização de vinhos. Finalmente, ABF1 possui
30 possibilidades como aditivo alimentício para diabéticos em

função do gosto doce e do efeito inibidor da digestão de sacarose ⁷⁵.

ABF1 foi isolada do fungo *T. reesei* e expressa em *Escherichia coli* no plasmídeo pLD. A atividade dessa enzima é testada por meio do uso do substrato p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo em 0,05 M de tampão de citrato incubado a 50°C por 10 minutos com extratos brutos de enzima de plantas ou *E. coli*. A reação é interrompida com 1 M de Na₂CO₃, e o p-nitrofenol resultante é medido por espectrofotômetro a 400 nm e comparado com o padrão positivo (p-nitrofenol ou ABF, ambos disponíveis comercialmente) para determinar a quantidade. Estudos de pH e temperatura ótimos são realizados com o mesmo substrato e medidos da mesma forma ⁷⁶. Sabidamente, a atividade dessa enzima é inibida por certos íons metálicos como, por exemplo, Cu²⁺, Hg²⁺, detergentes e muitos agentes quelantes e redutores ⁷⁵.

Lignina peroxidase (LipJ)

A enzima lignina peroxidase, comumente conhecida como LipJ, permanece inédita e desejável para o avanço da produção de enzimas para biocombustível por meio de tabaco transplastômico. A expressão de LipJ deve expandir os espectros de fontes de biomassa exploráveis por hidrólise da lignina não comestível e porções ricas em celulose de biomassa como, por exemplo, milho, cana de açúcar e trigo. Fontes previamente excluídas como fontes para biocombustível em função de seu teor elevado de lignina, por exemplo, restos de tábuas de madeira, lascas de madeira, cascas de frutas e vegetais preparados comercialmente, poderiam ser hidrolisadas com LipJ. LipJ

também avança na produção de biocombustíveis por ablação das estruturas intrincadas de lignina dentro de materiais de plantas dando acesso a substratos de biomassa mais valiosos que fornecem produtos comerciais, químicos e farmacêuticos valiosos. Esses produtos ainda possuem rendimento limitado, por causa da natureza protetora da lignina que os circunda dentro das fontes de biomassa.

LipJ foi isolada do DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis*, expressa em um plasmídeo funcional tanto em cloroplastos quanto em *E. coli*. Três cultivares de tabaco transplastômico estão expressando esse vetor na rodada primária de seleção e aguardam confirmação de expressão em cloroplasto. Foram planejados ensaios de proteína em *E. coli* para análise qualitativa e quantitativa da expressão de LipJ, que é otimizada para cloroplasto derivado de LipJ.

Lipase (LipY)

Lipase Y (LipY), de *Mycobacterium tuberculosis*, é uma enzima hidrossolúvel que catalisa a hidrólise de ligações éster e triacilgliceróis de cadeia longa, o que a torna um candidato ideal para a produção de biocombustível. LipY é uma proteína da membrana para *Mycobacterium tuberculosis* e estudos já demonstraram que ocorre uma resposta humoral quando LipY é combinada com o soro de pacientes com tuberculose; portanto, LipY tem o benefício adicional de ser uma vacina potencial para tuberculose⁷⁷.

Um ensaio simples para determinação da atividade do gene clonado é um ensaio em placa que envolve o corante fluorescente rodamina B e um extrato bruto de células lisadas. Se o gene estiver integrado adequadamente e a proteína dobrada corretamente, o ensaio exibirá uma cor

laranja quando iluminado sob um comprimento de onda de luz específico ⁸⁰. Outro ensaio mede a liberação de p-nitrofenol quando p-nitrofenilestearato é incubado em várias concentrações de *E. coli* ou extrato de célula de planta ⁸¹.

Exemplo 11: Expressão de enzimas de degradação de plantas em cultivares comerciais

Cloroplastos de tabaco foram transformados por bombardeamento com microprojéteis (transformação biolística), como descrito anteriormente. A integração do transgene foi confirmada por análise por PCR usando os iniciadores utilizados em estudos prévios. Análise *southern-blot* foi realizada para confirmar homoplasma. Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Petit Havana/LAMD/TN90) foram germinadas assepticamente em meio MSO em placas de Petri. As mudas germinadas foram transferidas para caixas púrpuras contendo meio MSO. As folhas no estágio de 3-7 folhas de crescimento de planta foram cortadas e colocadas abaxial viradas para cima em um papel de filtro Whatman em meio RMOP em placas de Petri (100 x 15 mm) para bombardeamento. Microprojéteis de ouro (0,6 µm) foram revestidos com DNA de plasmídeo (vetor de expressão de tabaco em cloroplasto) e a transformação biolística mediada foi realizada com o dispositivo biolístico PDS1000/He (Bio-Rad) como publicado. Após bombardeamento, as folhas foram incubadas no escuro por 48 horas para se recuperar do dano. Após 48 horas no escuro, as folhas bombardeadas de Petit Havana (cultivar experimental) ou LAMD e TN90 (cultivar comercial) foram cortadas em pedaços de 5 mm² e colocadas em placas (com o

lado bombardeado em contato com o meio) contendo RMOP com 500, 150 e 200 mg/l de espectinomicina, respectivamente, para a primeira rodada de seleção. Após 4-5 semanas, aparecerão brotos resistentes, enquanto células não transformadas morrerão. Os brotos resistentes serão transferidos para novas placas com RMOP-Espectinomicina e submetidos a rodadas subsequentes de seleção. Os supostos brotos transplastômicos foram confirmados por PCR e análise *Southern*. A expressão de enzimas de degradação da parede celular foi confirmada por seus respectivos ensaios, e para aquelas para as quais houvesse anticorpo disponível, a análise *western-blot* foi realizada.

Os cultivares comerciais geraram 40 toneladas métricas de biomassa de folhas frescas, em contraste com 2,2 tons no cultivar experimental Petit Havana. Os cultivares comerciais geraram biomassa 18 vezes mais do que o cultivar experimental (Cramer e cols., 1999). LAMD-609 é um híbrido com baixo teor de nicotina produzido por retrocruzamento de uma variedade do tipo Maryland, MD-609, com uma variedade *burley* que produz baixo teor de nicotina, LA Burley (Collins e cols., 1974); Tennessee 90 (TN 90) é um cultivar comercial usado por Philip Morris (Lancaster Laboratories, PA). Ambos os cultivares experimentais LAMD e TN 90 foram transformados com genes que codificam enzimas de degradação de biomassa. Embora seja mais desafiador transformar esses cultivares do que o cultivar experimental, tivemos sucesso na transformação de ambos os cultivares comerciais com diversos genes que codificam enzimas de degradação de biomassa pectato liases, celulasas, xilanases e endoglucanases. As linhagens transplastômicas de cultivares

comerciais eram homoplásmicas, férteis, e as atividades das enzimas expressas eram similares às do cultivar experimental, exceto que seu rendimento de biomassa foi bem maior do que Havana. A Tabela 8 mostra enzimas que foram introduzidas com sucesso em plantas, expressas e testadas quanto à atividade em cultivares experimentais e comerciais.

PCR foi feita usando DNA isolado de material de folha de plantas de controle e supostamente transgênicas a fim de distinguir transformantes de cloroplasto verdadeiros de transformantes nucleares ou mutantes. Foram preparadas duas reações de PCR separadas, uma reação verificou a integração de gene marcador selecionável no genoma do cloroplasto e a segunda verificou a integração do cassete de expressão transgênica. A fim de testar a integração do cloroplasto dos transgenes, um iniciador (3M) se destinará ao gene *aadA* enquanto o outro (3P) se destinará ao genoma nativo do cloroplasto. Nenhum produto de PCR foi obtido com plantas transgênicas nucleares ou mutantes usando esse conjunto de iniciadores. Essa seleção é importante para eliminar mutantes e transformantes nucleares. A fim de realizar a análise por PCR em plantas transgênicas, DNA total de plantas não bombardeadas e transgênicas foi isolado como descrito pelo mini kit de planta DNeasy (Qiagen). A integração do cassete de expressão transgênica foi testada usando o par de iniciadores 5P/2M. O iniciador 5P se destina ao gene *aadA* e 2M ao *trnA* e, portanto, o produto de PCR mostrou se o gene de interesse havia sido introduzido no genoma do cloroplasto por meio do processo de recombinação homóloga. Uma estratégia similar foi usada com

.
 .
 .
 .
 sucesso por PI lab para confirmar a integração no
 cloroplasto de vários genes estranhos. Os pedaços de folha
 de brotos PCR-positivos foram ainda selecionados para uma
 segunda rodada a fim de obter homoplasma.

5 Foram feitos *Southern-blots* para testar homoplasma.
 Há vários milhares de cópias do genoma do cloroplasto
 presentes em cada célula de planta. Quando são inseridos
 genes estranhos no genoma do cloroplasto, nem todos os
 cloroplastos irão integrar DNA estranho resultando em
 10 heteroplasma. Para assegurar que somente o genoma
 transformado exista em plantas transgênicas (homoplasma),
 o processo de seleção foi continuado. A fim de confirmar
 homoplasma ao final do ciclo de seleção, DNA total de
 plantas transgênicas foi sondado com as sequências
 15 flangeadoras de cloroplasto marcadas radioativamente (o
 fragmento *trnI-trnA*) usadas para recombinação homóloga.
 Caso estejam presentes genomas do tipo selvagem
 (heteroplasma), será observado o tamanho do fragmento
 nativo junto com genomas transformados. A presença de um
 20 fragmento grande em função da inserção de genes estranhos
 dentro das sequências flangeadoras e a ausência do pequeno
 fragmento nativo devem confirmar homoplasma.

A Figura 6 mostra a geração de cultivares comerciais
 transplastômicos de tabaco. (A) Enraizamento de broto de
 25 CelD LAMD. (B) plantas transplastômicas de CelD LAMD que
 crescem na estufa. (C) plantas transplastômicas de CelD
 LAMD que mostram floração normal. (D) transformante
 primário de CelD TN90. (E) Segunda rodada de regeneração
 para CelD TN90. (F) Enraizamento de PelB TN90. (G-I)
 30 Primeira, segunda e terceira rodadas de regeneração para

. PelB LAMD. (J) Enraizamento de broto de PelD LAMD. (K)
 . plantas transplastômicas PelD LAMD que crescem em estufa.
 . (L) Planta transplastômica PelD LAMD que mostra floração
 normal. (M) Enraizamento de broto eg1 LAMD. (N) Planta
 5 transplastômica eg1 LAMD que cresce em potes.

A Figura 7 mostra confirmação de homoplasma por
southern-blots usando sonda flanqueadora de tabaco. (A)
 CelD LAMD. (B) PelB LAMD. (C) PelB TN90. (D) PelD LAMD e
 (E) eg1 LAMD (UT: Planta não transformada; Números:
 10 Linhagens transplastômicas e B: Vazio). A Figura 8 mostra
 atividade enzimática de pectato liase B e D em cultivares
 de tabaco Petit Havana, TN90 e LAMD. (A) PelB. (B) PelD.
 Observação: o material de folha usado para a análise da
 atividade enzimática para cultivares de tabaco TN90 e LAMD
 15 foi colhido de plantas *in vitro*, enquanto o material de
 folha para Petit Havana é da estufa. Na medida em que o
 transgene é controlado por *psbA*, com a luz e elementos
 reguladores do desenvolvimento, espera-se que os níveis de
 expressão em cultivares comerciais sejam maiores quando
 20 transferidos para a estufa.

Tabela 8: Resumo de transformação e expressão bem sucedidas e enzimas ativas expressas recombinaantemente

Nome do gene	PCR-positivo	Estado em Southern	Em qual estágio	Nº de plantas	Material congelado (g)	Ensaio com protocolos de extrato de <i>E. coli</i>	Ensaio com extrato de plantas	Saúde da planta
celD	Sim, Petit Havana (PH)	Homoplasma	Sementes colhidas	Sementes germinadas T0	400	Sim	Sim	Normal
	Sim (LAMD)	Homoplasma	Sementes colhidas	Sementes germinadas T0	250		Sim	Normal
	Sim (TN90)	Não verificado	2ª rodada de seleção	4 clones			Sim	Normal
pelB	Sim (PH)	Homoplasma	Sementes	Sementes	700	Sim	Sim	Normal

				colhidas	germinadas T0					
	Sim (LAMD)	Homoplasma	Enraizamento	Enraizamento	18 plantas			Sim	Normal	
	Sim (TN90)	Homoplasma	Pronta para produção em estufa	Pronta para produção em estufa	30 plantas			Sim	Normal	
peld	Sim (PH)	Homoplasma	Sementes colhidas	Sementes colhidas	Sementes germinadas T0	600		Sim	Normal	
	Sim (LAMD)	Homoplasma	Sementes colhidas	Sementes colhidas	Sementes germinadas T0	340		Sim	Normal	
pela	Sim (PH)	Homoplasma	Pronta para produção em estufa	Pronta para produção em estufa	9			Sim	Normal	
Eg1	Sim (PH)	Homoplasma	Pronta para produção em estufa	Pronta para produção em estufa	9			Sim	Normal	

	Sim (LAMD)	Homoplasma	Pronta para produção em estufa	3			Sim	Normal
Eg11	Sim (PH)	Em progresso	Enraizamento	20			Em	Normal
	Sim (TN90)	Em progresso	2ª rodada de seleção	3 clones			Em progresso	Normal
Xyn2	Sim (PH)	Homoplasma	Pronta para produção em estufa	7			Sim	Normal
Swol	Sim (PH)	Homoplasma	Enraizamento	20			Sim	Folhas estão finas
Bgl1	Sim (PH)	Homoplasma	Pronta para produção em estufa	20			Em progresso	Normal
Cutinase	Sim (PH)	Em progresso	Enraizamento	15			Sim	Folhas estão finas
celo	Sim (PH)	Heteroplasma	Enraizamento	20			Sim	Normal

									progresso	
	Avaliação (LAMD)	Em progresso	2ª rodada de seleção	5 clones		Sim	Em progresso	Normal		
Axel	Bombardeada em todos os cultivares	-----	Em meio de seleção RMOP			Sim				
lipY	Bombardeada em todos os cultivares	-----	Em meio de seleção RMOP			Sim				
lipJ	Bombardeada em todos os cultivares	-----	Em meio de seleção RMOP			Sim				
ManI	Bombardeada em todos os cultivares	-----	Em meio de seleção RMOP			Sim				
AbfI	Bombardeada em todos os cultivares	-----	Em meio de seleção RMOP							

As revelações dos documentos de patente, publicações e referências citados, incluindo aqueles citados nas Tabelas II-VII, são aqui incorporados em sua totalidade na medida em que não sejam inconsistentes com os ensinamentos aqui apresentados. Deve-se entender que os exemplos e as modalidades aqui descritas têm finalidade apenas ilustrativa, e que várias modificações ou alterações à luz destes serão sugeridas por aqueles habilitados na técnica e devem ser incluídas no espírito e abrangência deste pedido.

10 LISTA DE REFERÊNCIAS PARA OS EXEMPLOS 1-8

1. Robertson, G.P. e cols. "AGRICULTURE: Sustainable Biofuels Redux". *Science* 322, 49-50 (2008).

2. Sticklen, M.B. "Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol".
15 *Nat. Rev. Genet.* 9, 433-443 (2008).

3. Merino, S.T. e Cherry, J. "Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology" 95-120 (Springer Berlin/Heidelberg, 2007).

20 4. Wyman, C.E. e cols. "Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies". *Bioresour. Technol.* 96, 1959-1966 (2005).

5. Grohmann, K., Baldwin E.A., Buslig, B.S. e Ingram L.O "Fermentation of galacturonic acid and other sugars in
25 orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of *Escherichia coli*". *Biotechnology Letters* 16, 281-286 (1994).

6. Himmel, M.E. e cols. "Advanced bioethanol production technologies: a prospective". Em "ACS Symposium
30 666", 2-45. 1997. "American Chemical Society Washington",

DC. Tipo de Ref.: "Conference Proceeding".

7. Himmel, M.E., Ruth, M.F. e Wyman, C.E. "Cellulase for commodity products from cellulosic biomass". *Current Opinion in Biotechnology* 10, 358-364 (1999).

5 8. Taylor II, L.E. e cols. "Heterologous expression of glycosyl hydrolases in planta: a new departure for biofuels". *Trends in Biotechnology* 26, 413-424 (2008).

9. Ziegelhoffer, T., Will, J. e Ustin-Phillips, S. "Expression of bacterial cellulase genes in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)". *Molecular Breeding* 5, 309-318 (1999).

10. Kawazu, T. e cols. "Expression of a bacterial endoglucanase gene in tobacco increases digestibility of its cell wall fibers". *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88, 421-425 (1999).

11. Dai, Z., Hooker, B.S., Anderson, D.B. e Thomas, S.R. "Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: expression optimization and tissue targeting". *Molecular Breeding* 6, 277-285 (2000).

12. Montalvo-Rodriguez, R. e cols. "Autohydrolysis of plant polysaccharides using transgenic hyperthermophilic enzymes". *Biotechnology and Bioengineering* 70, 151-159 (2000).

25 13. Xu, X. e cols. "Expression of a bacterial I α -amylase gene in transgenic rice seeds". *Transgenic Research* 17, 645-650 (2008).

14. Martinez, D. e cols. "Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*)". *Nat. Biotech.* 26, 553-560

- (2008).
15. Rubin, E.M. "Genomics of cellulosic biofuels". *Nature* 454, 841-845 (2008).
 16. Verma, D. e Daniell, H. "Chloroplast vector
5 systems for biotechnology applications". *Plant Physiol.* 145, 1129-1143 (2007).
 17. Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T. e Wiebe, P.O. "Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco
10 chloroplasts". *Journal of Molecular Biology* 311, 1.001-1.009 (2001).
 18. De Cosa, B., Moar, W., Lee SB., Miller, M. e Daniell, H. "Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals".
15 *Nat. Biotechnol.* 19, 71-74 (2001).
 19. Lee, S.B. e cols. "Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance". *Molecular Breeding* 11, 1-13 (2003).
 20. Singh, N.D., Li, M., Lee, S.B., Schnell, D. e Daniell, H. "Arabidopsis Tic40 Expression in Tobacco Chloroplasts Results in Massive Proliferation of the Inner Envelope Membrane and Upregulation of Associated Proteins". *Plant Cell tpc* (2008).
 21. Daniell, H". Transgene containment by
25 maternal inheritance: Effective or elusive?" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 6.879-6.880 (2007).
 22. Ruf, S., Karcher, D. e Bock, R. "Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation". *Proceedings of the National Academy of
30 Sciences* 104, 6.998-7.002 (2007).

23. Svab, Z. e Maliga, P. "Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7.003-7.008 (2007).
24. Gray, B.N., Ahner, B.A. e Hanson, M.R. "High-level bacterial cellulose accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions". *Biotechnology and Bioengineering* xxx, xxx (2008).
25. Leelavathi, S., Gupta, N., Maiti, S., Ghosh, A. e Siva Reddy, V. "Overproduction of an alkali- and thermostable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme". *Molecular Breeding* 11, 59-67 (2003).
26. Yu, L.X. e cols. "Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco". *Journal of Biotechnology* 131, 362-369 (2007).
27. Brixey, P.J., Guda, C. e Daniell, H. "The chloroplast psbA promoter is more efficient in Escherichia coli than the T7 promoter for hyperexpression of a foreign protein. *Biotechnology Letters* 19, 395-400 (1997).
28. Daniell, H., Ruiz, O.N. e Dhingra, A. "Chloroplast Genetic Engineering to Improve Agronomic Traits". *Methods Mol. Biol.* 286, 111-138 (2005).
29. Verma, D., Samson, N.P., Koya, V. e Daniell, H. "A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts". *Nat. Protocols* 3, 739-758 (2008).
30. Guo, W., Gonzalez-Candelas, L. e Kolattukudy, P.E. "Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene pelB from *Fusarium solani* f. sp. pisi (Nectria

- haematococca, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*". *J. Bacteriol.* 177, 7.070-7.077 (1995).
31. Miller, G.L. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry* 31, 426-428 (1959).
32. Ghose, T.K. "Measurement of cellulase activities". *Pure and Applied Chemistry* 59, 257-268 (1987).
33. Arlen P.A. e cols. "Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b". *Plant Biotech. J.* 5, 511-525 (2007).
- 33a. Cramer, C.L., Boothe, J.G. e Oishi, K.K. "Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240, 95-118 (1999).
34. Ruhlman, T.F., Ahangari, R.F., Devine, A.F., Samsam, M.F. e Daniell, H. "Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts-oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice". *Plant Biotech. J.* 5, 495-510 (2007).
35. Bally, J. e cols. "Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins". *Plant Biotech. J.* 6, 46-61 (2008).
36. Chauvaux, S. e cols. "Calcium-binding affinity and calcium-enhanced activity of *Clostridium thermocellum* endoglucanase D". *Biochem. J.* 265, 261-265 (1990).
37. Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A. e Schwarz, W.H. "A newly described cellulosomal cellobiohydrolase,

- CelO, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose". *Microbiology* 148, 247-255 (2002).
38. Irwin DC, Spezio, M., Walker LP e Wilson, D.B.
5 "Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects". *Biotechnology and Bioengineering* 42, 1.002-1.013 (1993).
39. Zhou, S. e Ingram, L.O. "Synergistic Hydrolysis of Carboxymethyl Cellulose and Acid-Swollen Cellulose by Two
10 Endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*". *J. Bacteriol.* 182, 5.676-5.682 (2000).
40. Gusakov AV e cols. "Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose". *Biotechnology and Bioengineering* 97, 1.028-1.038 (2007).
- 15 41. Yapo, B.M., Lerouge, P., Thibault, J.F. e Ralet, M.C. "Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II". *Carbohydrate Polymers* 69, 426-435 (2007).
- 20 42. Rosgaard, L., Pedersen S e Meyer, A.S. "Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 284-296 (2007).
43. Selig, M.J., Knoshaug, E.P., Adney, W.S., Himmel,
25 M.E. e Decker, S.R. "Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities". *Bioresource Technology* 99, 4.997-5.005 (2008).
44. Rosgaard, L. e cols. "Evaluation of minimal
30 *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently

- pretreated Barley straw substrates". *Biotechnol. Prog.* 23, 1.270-1.276 (2007).
45. Guo, W., González-Candelas, L. e Kolattukudy, P.E. "Identification of a Novel pectate lyase Gene Expressed Uniquely in
5 Planta by *Fusarium solani* f. sp. *Pisi* (*Nectria haematococca*, Mating Type VI) and Characterization of Its Protein Product as an Endo-Pectate Lyase". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 332, 305-312 (1996).
46. Soliday, C.L., Flurkey, W.H., Okita, T.W. e
10 Kolattukudy, P.E. "Cloning and structure determination of cDNA for cutinase, an enzyme involved in fungal penetration of plants". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 3.939-3.943 (1984).
47. Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S. e Lee,
15 S.B. "Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome". *Nat. Biotech.* 16, 345-348 (1998).
48. Kumar, S. & Daniell, H. "Engineering the
Chloroplast Genome for Hyperexpression of Human Therapeutic
20 Proteins and Vaccine Antigens" em *Recombinant Gene Expression* 365- 383 (2004).
49. Crawford, M.S. e Kolattukudy, P.E. "Pectate lyase
from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: Purification,
characterization, in vitro translation of the mRNA, and
25 involvement in pathogenicity". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 258, 196-205 (1987).
50. Gonzalez-Candelas, L. e Kolattukudy, P.E. "Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase
gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp.
30 *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI)". *J.*

Bacteriol. 174, 6.343-6.349 (1992).

LISTA DE REFERÊNCIAS PARA OS EXEMPLOS 10-11

LISTA DE REFERÊNCIAS

1. Robertson, G.P. e cols. "AGRICULTURE: Sustainable
5 Biofuels Redux". *Science* 322, 49-50 (2008).
2. Sticklen, M.B. "Plant genetic engineering for
biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol".
Nat. Rev. Genet. 9, 433-443 (2008).
3. Merino, S.T. e Cherry, J. "Progress and Challenges
10 in Enzyme Development for Biomass Utilization in Advances"
Em *Biochemical Engineering/Biotechnology* 95-120 (Springer
Berlin/Heidelberg, 2007).
4. Wyman, C.E. e cols. "Coordinated development of
leading biomass pretreatment technologies". *Bioresour.*
15 *Technol.* 96, 1.959-1.966 (2005).
5. Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S. e Ingram,
L.O. "Fermentation of galacturonic acid and other sugars in
orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of
Escherichia coli". *Biotechnology Letters* 16, 281-286
20 (1994).
6. Himmel, M.E. e cols. "Advanced bioethanol
production technologies: a prospective". Em "ACS Symposium
666", 2-45. 1997. "American Chemical Society Washington",
DC. Tipo de Ref.: "Conference Proceeding".
- 25 7. Himmel, M.E., Ruth, M.F. e Wyman, C.E. "Cellulase
for commodity products from cellulosic biomass". *Current
Opinion in Biotechnology* 10, 358-364 (1999).
8. Taylor II, L.E. e cols. "Heterologous expression of
glycosyl hydrolases in planta: a new departure for
30 biofuels". *Trends in Biotechnology* 26, 413-424 (2008).

9. Ziegelhoffer, T., Will, J. e Justin-Phillips, S.
 "Expression of bacterial cellulase genes in transgenic
 alfalfa (*Medicago sativa* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.)
 and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)". *Molecular Breeding* 5,
 5 309-318 (1999).
10. Kawazu, T. e cols. "Expression of a bacterial
 endoglucanase gene in tobacco increases digestibility of
 its cell wall fibers". *Journal of Bioscience and
 Bioengineering* 88, 421-425 (1999).
- 10 11. Dai, Z., Hooker, B.S., Anderson, D.B. e Thomas,
 S.R. "Improved plant-based production of E1 endoglucanase
 using potato: expression optimization and tissue
 targeting". *Molecular Breeding* 6, 277-285 (2000).
- 15 12. Montalvo-Rodriguez, R. e cols. "Autohydrolysis of
 plant polysaccharides using transgenic hyperthermophilic
 enzymes". *Biotechnology and Bioengineering* 70, 151-159
 (2000).
13. Xu, X. e cols. "Expression of a bacterial a-
 amylase gene in transgenic rice seeds". *Transgenic Research*
 20 17, 645-650 (2008).
14. Martinez, D. e cols. "Genome sequencing and
 analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei*
 (syn. *Hypocrea jecorina*)". *Nat. Biotech.* 26, 553-560
 (2008).
- 25 15. Rubin, E.M. "Genomics of cellulosic biofuels".
Nature 454, 841-845 (2008).
16. Verma, D. e Daniell, H. "Chloroplast vector
 systems for biotechnology applications". *Plant Physiol.*
 145, 1.129-1.143 (2007).
- 30 17. Daniell, H., Lee, S.B., Panchal, T. e Wiebe, P.O.

- "Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts". *Journal of Molecular Biology* 311, 1.001-1.009 (2001).
- 5 18. De Cosa, B., Moar, W., Lee, S.B., Miller, M. e Daniell, H. "Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals". *Nat. Biotechnol.* 19, 71-74 (2001).
- 10 19. Lee, S.B. e cols. "Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance". *Molecular Breeding* 11, 1-13 (2003).
- 15 20. Singh, N.D., Li, M., Lee, S.B., Schnell, D. e Daniell, H. "Arabidopsis Tic40 Expression in Tobacco Chloroplasts Results in Massive Proliferation of the Inner Envelope Membrane and Upregulation of Associated Proteins". *Plant Cell* 20, 3.405-3.417 (2008).
- 20 21. H. Daniell, S. Kumar e N. Duformantel (2005) "Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops". *Trends in Biotechnology*, 23: 238-245.
22. Daniell, H. "Transgene containment by maternal inheritance: Effective or elusive?" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 6.879-6.880 (2007).
- 25 23. H. Daniell (2002) "Molecular strategies for gene containment in transgenic crops". *Nature Biotechnology* 20: 581-587.
- 30 24. Gray, B.N., e cols., "High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions". *Biotechnology and Bioengineering* 102, 1.045-1.054 (2008).

25. Leelavathi, S., Gupta e Siva Reddy, V.
"Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme".
Molecular Breeding 11, 59-67 (2003).
- 5 26. Yu, L.X. e cols. "Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco". *Journal of Biotechnology* 131, 362-369 (2007).
27. Brixey, P.J., Guda, C. e Daniell, H. "The chloroplast psbA promoter is more efficient in *Escherichia coli* than the T7 promoter for hyperexpression of a foreign protein". *Biotechnology Letters* 19, 395-400 (1997).
- 10 28. Daniell, H., Ruiz, O.N. e Dhingra, A. "Chloroplast Genetic Engineering to Improve Agronomic Traits". *Methods Mol. Biol.* 286, 111-138 (2005).
- 15 29. Verma, D., Samson, N.P., Koya, V. e Daniell, H. "A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts". *Nat. Protocols* 3, 739-758 (2008).
30. Guo, W., Gonzalez-Candelas, L. e Kolattukudy, P.E. "Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene pelB from *Fusarium solani* f. sp. pisi (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*". *J. Bacteriol.* 177, 7070-7077 (1995).
- 20 31. Miller, G.L. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar". *Analytical Chemistry* 31, 426-428 (1959).
32. Ghose, T.K. "Measurement of cellulase activities". *Pure and Applied Chemistry* 59, 257-268 (1987).
33. Cramer, C.L., Boothe, J.G. e Oishi, K.K.
- 30 "Transgenic plants for therapeutic proteins: linking

- upstream and downstream strategies". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240, 95-118 (1999).
34. Collins G.B., Legg P.D., Kasperbauer MC. "Tobacco hybrid LAMD-609". *Crop Sci.* 14, 72-80 (1974).
- 5 35. Arlen P.A. e cols. "Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b". *Plant Biotech. J.* 5, 511-525 (2007).
- 10 36. Ruhlman, T.F., Ahangari, R.F., Devine, A.F., Samsam, M.F. e Daniell, H. "Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts-oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice". *Plant Biotech. J.* 5, 495-510 (2007).
- 15 37. Bally, J. e cols. "Both the stroma and thylakoid lumen of tobacco chloroplasts are competent for the formation of disulphide bonds in recombinant proteins". *Plant Biotech. J.* 6, 46-61 (2008).
- 20 38. Chauvaux, S. e cols. "Calcium-binding affinity and calcium-enhanced activity of *Clostridium thermocellum* endoglucanase D". *Biochem. J.* 265, 261-265 (1990).
- 25 39. Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A. e Schwarz, W.H. "A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, Cel10, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose". *Microbiology* 148, 247-255 (2002).
40. Irwin, D.C., Spezio, M., Walker, L.P. e Wilson, D.B. "Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnology and Bioengineering*" 42, 1.002-1.013 (1993).
- 30 41. Zhou, S. & Ingram, L.O. "Synergistic Hydrolysis of

- Carboxymethyl Cellulose and Acid-Swollen Cellulose by Two Endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*". *J. Bacteriol.* 182, 5.676-5.682 (2000).
42. Gusakov, A.V. e cols. "Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose". *Biotechnology and Bioengineering* 97, 1.028-1.038 (2007).
43. Yapo, B.M., Lerouge, P., Thibault, J.F. e Ralet, M.C. "Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II". *Carbohydrate Polymers* 69, 426-435 (2007).
44. Rosgaard, L., Pedersen, S. e Meyer, A.S. "Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 284-296 (2007).
45. Selig, M.J., Knoshaug, E.P., Adney, W.S., Himmel, M.E. e Decker, S.R. "Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities". *Bioresource Technology* 99, 4.997-5.005 (2008).
46. Rosgaard, L. e cols. "Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated Barley straw substrates". *Biotechnol. Prog.* 23, 1.270-1.276 (2007).
47. Crawford, M.S. e Kolattukudy, P.E. "Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. pisi: Purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 258, 196-205 (1987).
48. Gonzalez-Candelas, L. e Kolattukudy, P.E.

- - "Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase
- gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp.
- pisi (*Nectria haematococca*, mating population VI). *J. Bacteriol.* 174, 6.343-6.349 (1992).
- 5 49. Holtzapple, M.T. "Cellulose". Em: Macrae R, Robinson R.K., Saddler M.J., editors. "Encyclopedia of food science food technology and nutrition". Londres: Academic Press; 1993. p. 758-67.
50. Jarvis, M. "Cellulose stacks up". *Science* 426,
10 611-2 (2003).
51. Zhang, Y.H.P. e Lynd, L.R. "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems". *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797-824 (2004).
- 15 52. Berner, R.A. "The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition". *Nature* 426, 323-6 (2003).
53. Demain, A.L., Newcomb, M. e Wu, J.H.D. "Cellulase, clostridia, and ethanol". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69,
20 124-54 (2005).
54. O'Sullivan, A.C. "Cellulose: the structure slowly unravels". *Cellulose* 4, 173-207 (1997).
55. Lynd, L.R., Weimer, P.J. e van Zyl, W.H. "Pretorius IS. Microbial cellulose utilization:
25 fundamentals and biotechnology". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506-77 (2002).
56. Wyman, C.E. "Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and Power". *Biotechnol. Prog.* 19, 254-262 (2003).
- 30 57. Bayer, E.A., Lamed, R. e Himmel, M.E. "The

- potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management". *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 237-245 (2007).
58. Knowles, J., Lehtovaara, P. e Teeri, T. "Cellulase families and their genes". *Trends Biotechnol.* 5, 255-261 (1987).
59. Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Nieves, R.A., Thomas, S.R. "Cellulases: structure, function and applications". Em: Wyman C.E., editor. "Handbook on Bioethanol". 144-61 (1993).
60. Zhang, Y-H.P., Himmel, M.E. e Mielenz, J.R. "Outlook for cellulase improvement: Sreening and selection strategies". *Biotechnol. Adv.* 24, 452-481 (2006).
61. Biely, P. "Microbial xylanolytic systems", *Trends Biotechnology* 3, 286-290 (1985).
62. Tenkanen, M, Puls, J. e Potanen, K. "Two major xylanases of *Trichoderma reesei*, Enzyme and Microbial Technology" 14: 566-574 (1992).
63. Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S. e Monti, R. "Xylanases from fungi: properties and industrial applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*; 67, 577-591 (2005).
64. Baily, M.J. e Poulanen, K. "Production of xylanases by strains of *Aspergillus*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 5-10 (1989).
65. Kolattukudy, P.E. "Biopolyester Membranes of Plants: Cutin and Suberin". 208, 990-1000 (1980).
66. Kolattukudy, P.E. "Polyesters in higher plants". *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 1-49 (2001).
67. Kolattukudy, P.E. "Detection of an N-terminal

- glucuronamide linkage in proteins". *Methods Enzymol.* 106, 210-7 (1984).
68. Egmond, M.R. e De Vlieg, J. "Fusarium solani pisi cutinase". *Biochimie* 82, 1.015-1.021 (2000).
- 5 69. Sieber, P., Schorderet, M., Ryser, U., Buchala, A., Kolattukudy, P., Métraux, J.P. e Nawrath, C. "Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions". *Plant Cell* 12, 721-10 38 (2000).
70. Dhawan, S e Kaur, J. "Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications", *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 197-216 (2007).
71. Moreira, L.R.S. e Filho, E.X.F. "An overview of 15 mannan structure and mannan-degrading enzyme systems". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 165-178 (2008).
72. Stalbrand, e cols., "Purification and characterization of two (3-Mannanases from *Trichoderma reesei*", *Journal of Biotechnology*, 29, 229-242 (1993).
- 20 73. Mc Cleary, "β-D Mannanase". *Methods in enzymology*, 160, 596- 610 (1988).
74. Downie e cols., "A new assay for quantifying endo β-D mannanase activity using congo red dye". *Phytochemistry*. 36, 829-835, (1994).
- 25 75. Numan, M.T. "Alpha-L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 247-260 (2006).
76. Poutanen, K. "An alpha-L-arabinofuranosidase of 30 *Trichoderma Reesei*". *Journal of Biotechnology* 7, 271-282

- (1988).
77. Arora, D., e cols. "Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase". *Enzyme and Microbial Technology* 28, 602-605 (2001).
- 5 78. Archibald, F.S. "A New Assay for Lignin-Type Peroxidases Employing the Dye Azure B". *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3.110-3.116 (1992).
79. Mishra, K. C. e cols., "Functional role of the PE domain and immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* triacylglycerol hydrolase LipY". *Infect. Immun.* 76, 127-140
- 10 (2008).
80. Kouker, G., Jaeger, K.E. "Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases". *Applied and Environmental Microbiology* 53, 211-213 (1987).
- 15 81. Deb, C., Daniel. J. e Kolattukudy, P.E., "A Novel Lipase Belonging to the Hormone-sensitive Lipase Family Induced under Starvation to Utilize Stored Triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*." *The Journal of Biological Chemistry* 281, 3.866-3.875 (2006).

REIVINDICAÇÕES

1. Método de degradação de uma amostra de biomassa de planta de modo a liberar açúcares fermentáveis nessa amostra, o método caracterizado por compreender as etapas

5 de:

i) obter um coquetel de degradação de plantas preparado a partir de material vegetal moído compreendendo proteínas recombinantes expressas em plastídios de pelo menos uma planta transplastômica, as referidas proteínas

10 recombinantes consistindo em swolenina, endoglucanase CelD, endoglucanase CelO, beta-glicosidase, xilanase, acetil xilana esterase, enzimas pectato liase PelA, pectato liase PelB e pectato liase PelD, o referido coquetel compreendendo um tampão e, opcionalmente, um ou mais de um

15 extrato de células bacterianas compreendendo um composto de degradação de planta e uma lipase; e

ii) incubar o referido coquetel de degradação de plantas com a referida amostra de biomassa entre 30°C e 50°C em um pH entre 6 a 10 para liberar 100% de açúcares

20 fermentáveis da referida biomassa.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido coquetel compreende ainda pelo menos um extrato celular bacteriano.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1,

25 caracterizado pelo fato de que a referida amostra de biomassa de planta compreende grãos e/ou resíduos de grãos, beterraba, cana de açúcar, gramas, biomassa à base de madeira, frutas e/ou resíduos de frutas, ou uma combinação destes.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3,

30

caracterizado pelo fato de que a referida biomassa de planta é milho, trigo, cevada ou cítricos, ou resíduos deles obtidos.

5 5. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida biomassa de planta é capim-elefante.

6. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida biomassa de planta é cana de açúcar.

10 7. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida biomassa de planta é beterraba.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido coquetel de
15 degradação de plantas ainda compreende rubisco.

9. Coquetel de degradação de plantas útil para a degradação de uma biomassa de planta, o referido coquetel caracterizado por compreender enzima de degradação de plantas expressas recombinantemente em plastídios de
20 células de plantas, em que as referidas enzimas consistem em endonuclease CelD, endonuclease CelO, beta-glicosidase, xilanase, acetil xilana esterase, pectato liase PelA, pectato liase PelB e pectato liase PelD, o referido coquetel compreendendo ainda swolenina, um tampão, e
25 opcionalmente inibidores de protease, a referida swolenina e as referidas enzimas de degradação de plantas no referido coquetel de degradação de plantas atuando sinergicamente para liberar 100% de açúcares fermentáveis produzidos a partir da referida amostra de biomassa.

30 10. Coquetel, de acordo com a reivindicação 9,

caracterizado pelo fato de que o referido tampão é um tampão de acetato de sódio e/ou um tampão de Tris-HCl.

11. Material de planta homogeneizado, caracterizado por compreender enzimas recombinantemente expressas
5 produzidas em plastídios de plantas superiores, em que as referidas enzimas recombinantemente expressas consistem em endogluconase CelD, endoglucanase CelO, beta-glicosidase, acetil xilana esterase, pectato lisase PelA, pectato liase PelB e pectato liase PelD; o referido material de planta
10 opcionalmente compreendendo rubisco e/ou swolenina, o referido material compreendendo ainda inibidores de protease e azida de sódio.

12. Material de planta homogeneizado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a enzima
15 compreende mais de 0,1 por cento de proteína total no referido material de planta em pó.

13. Material de planta homogeneizado, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido material de planta compreende rubisco.

20 14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido material de planta está homogeneizado.

15. Material de planta, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a proporção de enzima
25 para rubisco é de 99:1 a 1:99; 50:1 a 1:50; 25:1 a 1:25; 10:1 a 1:10; 5:1 a 1:5; ou 2:1 a 1:2.

16. Coquetel de enzimas de degradação de plantas útil na digestão de uma amostra de biomassa à base de madeira, caracterizado por consistir em extratos de proteínas
30 recombinantes expressas em cloroplastos, as referidas

proteínas recombinantes consistindo em endogluconase CelD, endoglucanase CelO, beta-glicosidase, xilanase, swolenina, acetil xilana esterase, pectato lisase PelA, pectato liase PelB e pectato liase PelD.

5 17. Coquetel, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o referido coquetel compreende um coquetel de inibidor de protease e azida de sódio.

10 18. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido tampão é um tampão de acetato de sódio ou um tampão de Tris-HCl.

Figura 1

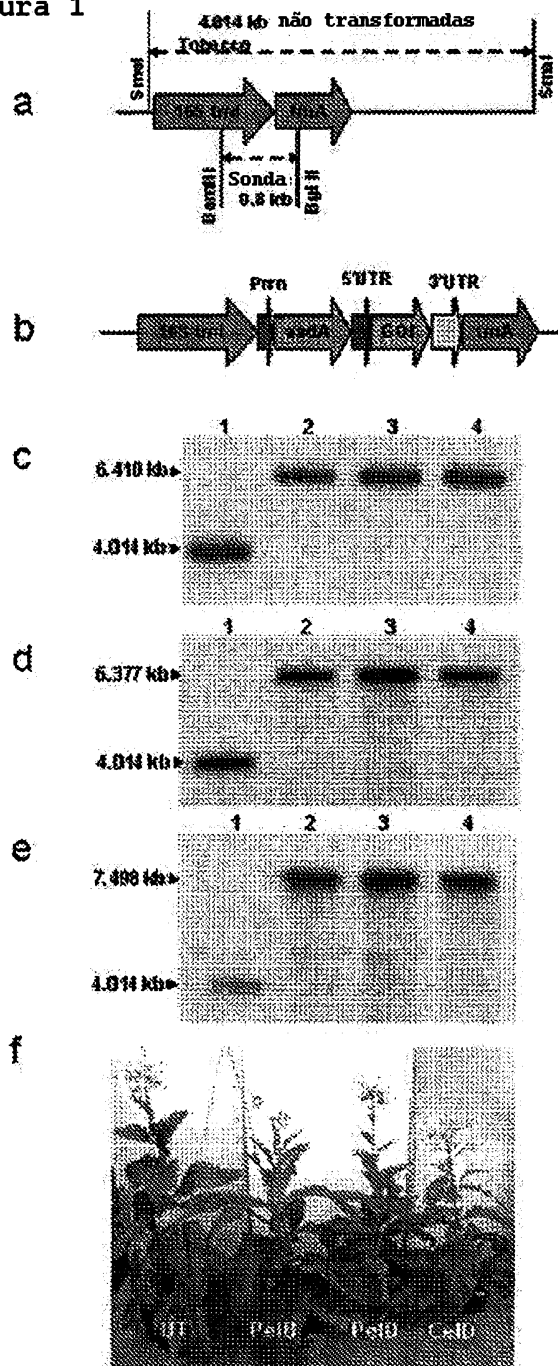


Figura 2

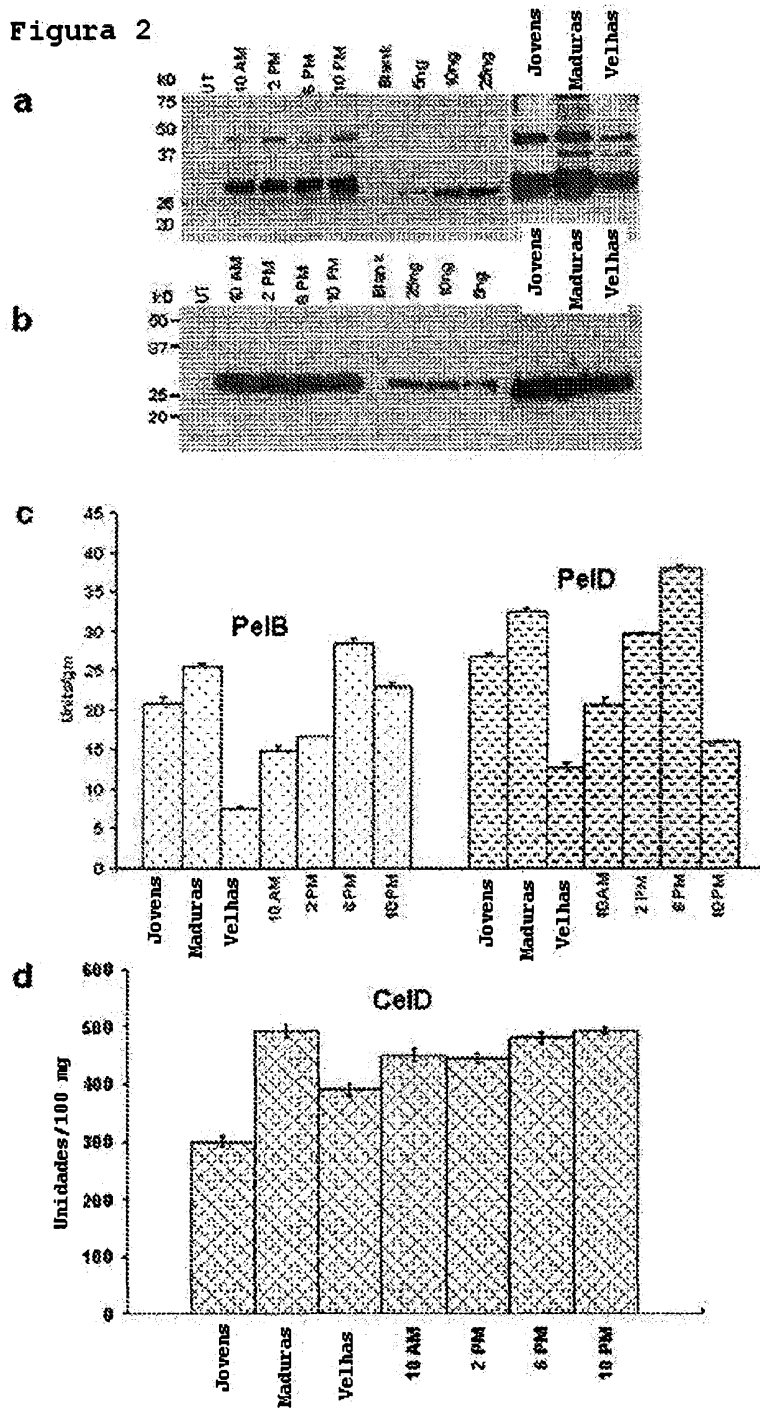


Figura 3

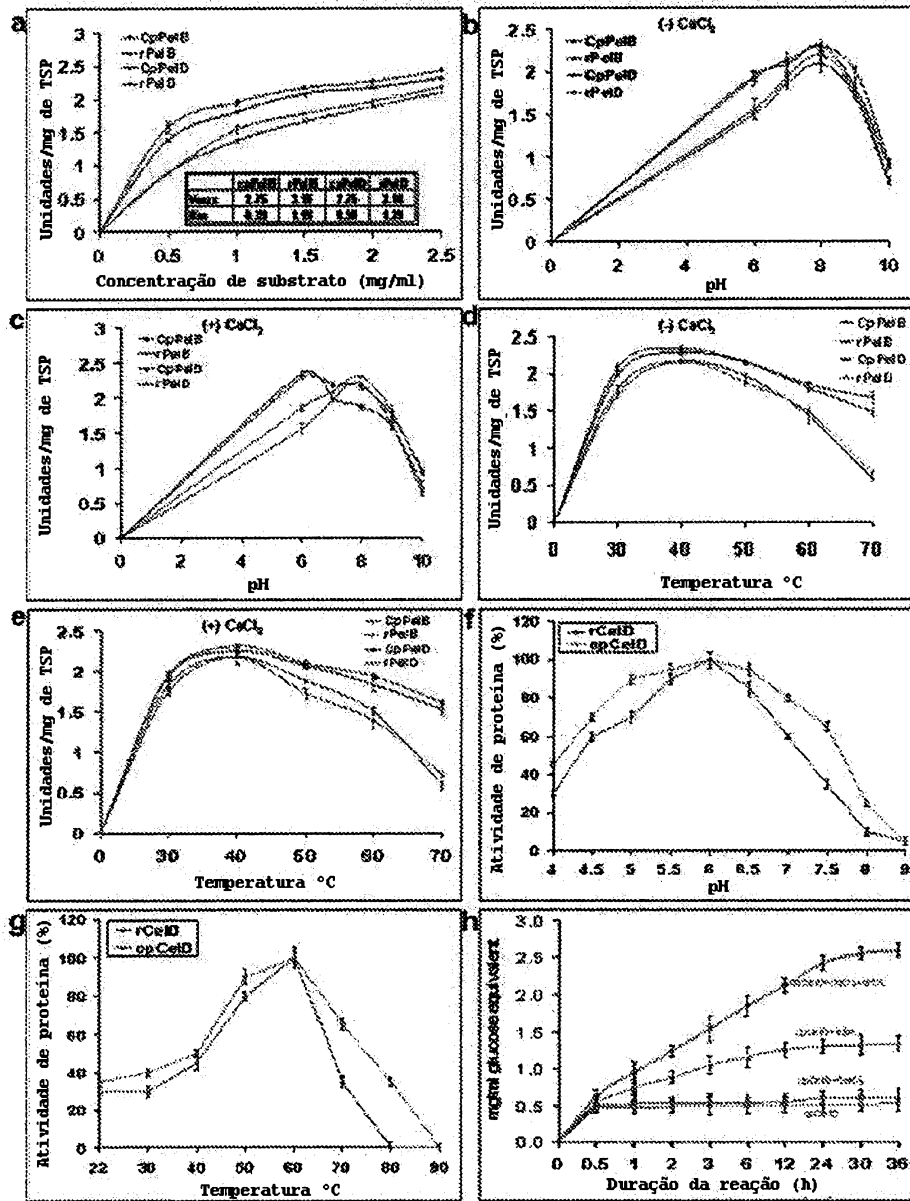


Figura 4

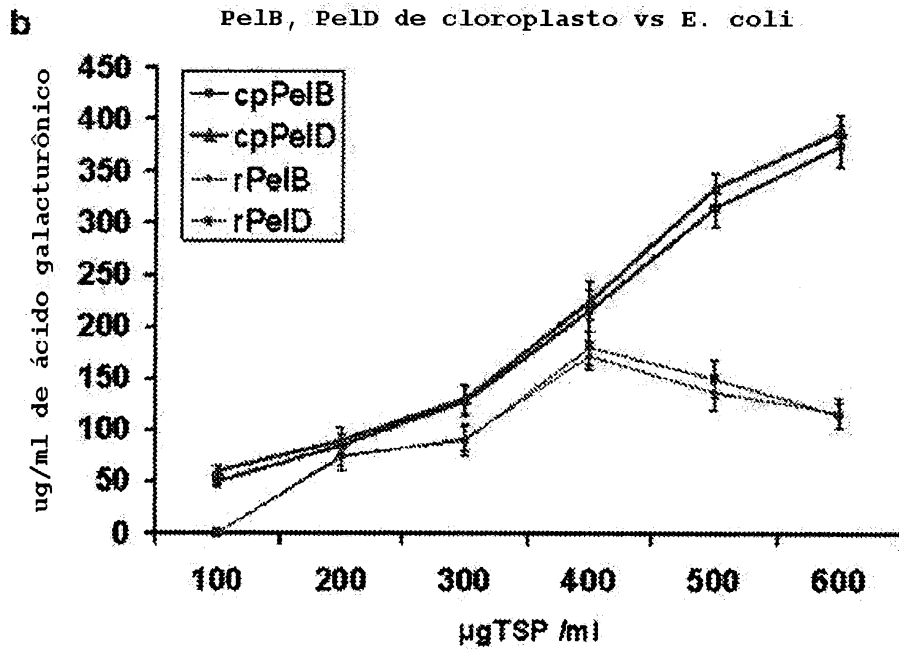
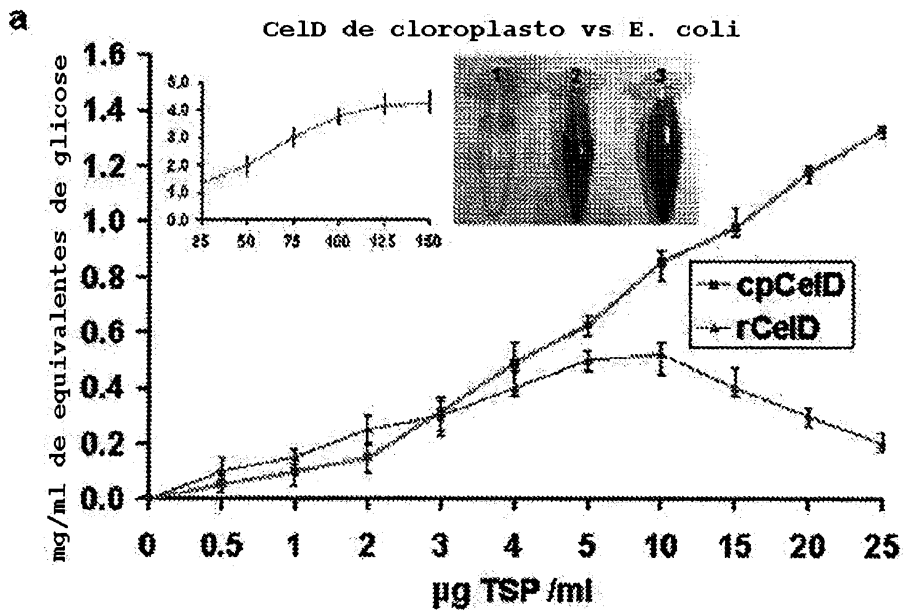
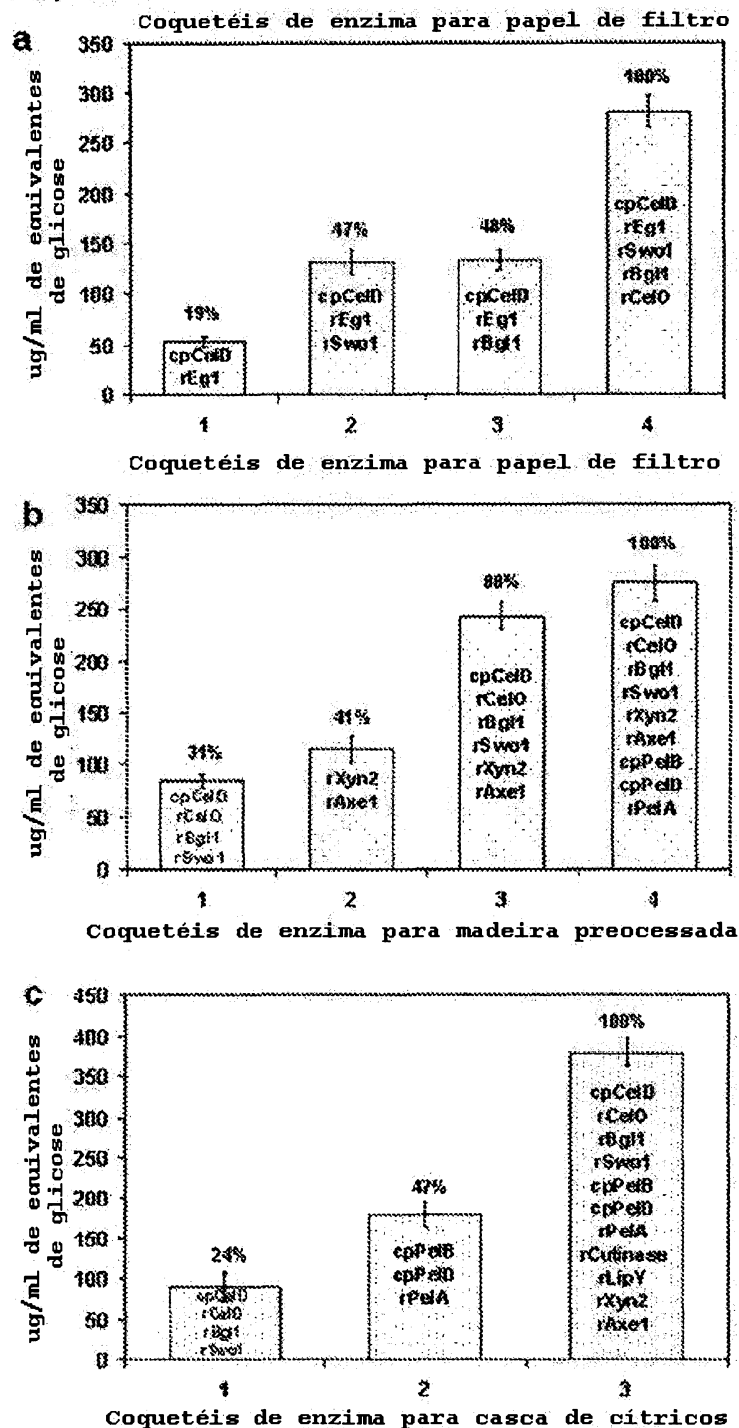


Figura 5



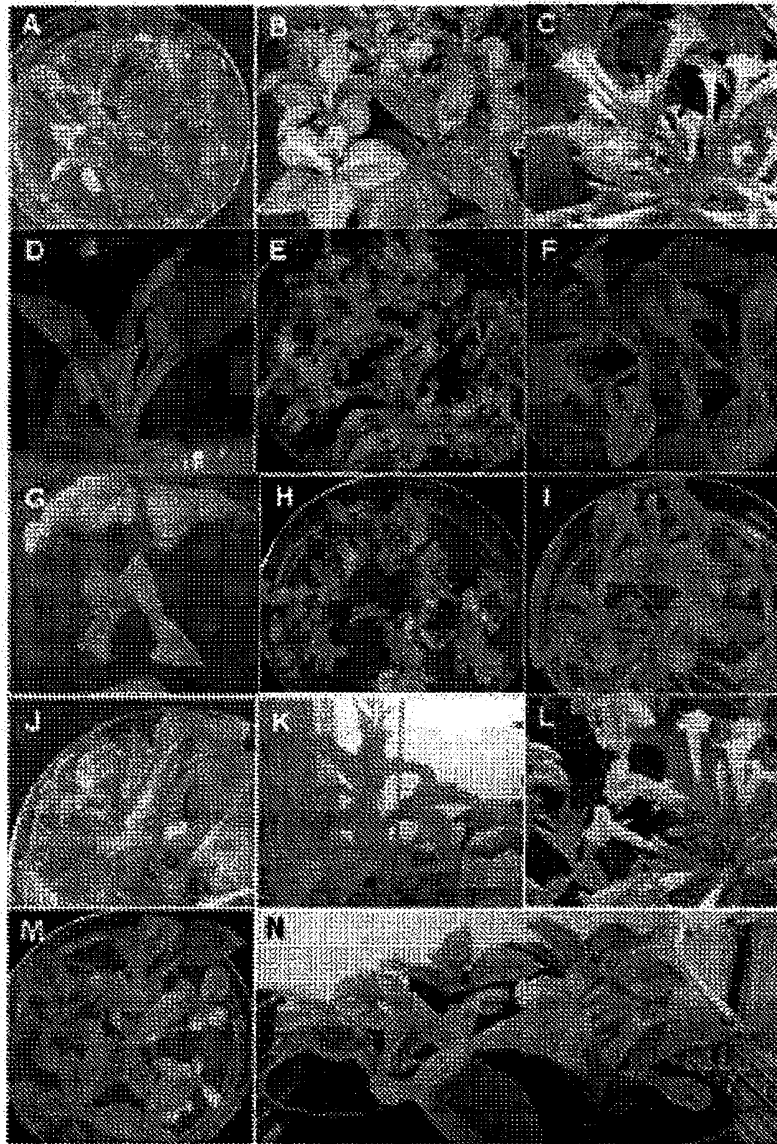


Figura 6

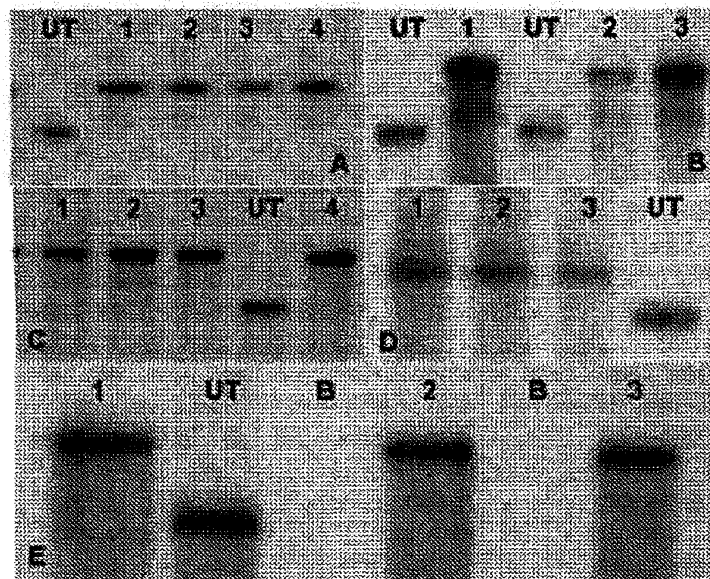


Figura 7

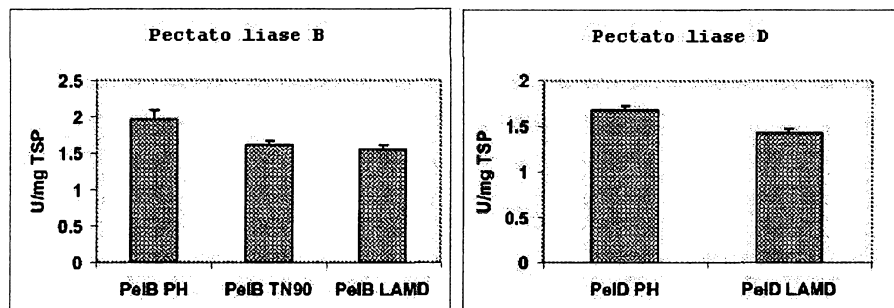


Figura 8

Figura 9 - Lista de seqüências exemplares

Gene de celD de Clostridium thermocellum para endoglucanase D
Nº de acesso X04584

```

1 aaactaaaaac tccatccaa taccttagtt cagttccagc atacgtctgt attcaaaatg
61 cctgtattta taactgcatt tataatacct gaagcaata ataattaaac ttgtggaaga
121 aaggaggttg caacaggttt taaattatct taattcaggt attttacaat ttttaataaa
181 aagggggata aaggtaaaaa atgagttaga tgaccttgaa aagcagcatg aaaaaacgtg
241 tgtatccttt gctcattgct gtatgtttte taagcttgac cggagtattt ccttcgggat
301 tgattgagac caaagtgtca gctgcaaaaa taacggagaa ttatcaattt gattcacgaa
361 tccgttttaa ctcaataggt tttatacaga accacagcaa aaaggcgact atagctgcaa
421 attgttcaac cttttatggt gtttaagaag acggaacaat agtgatatcc ggaacggcaa
481 cttcaatggt tgacaatgat acaaaagaaa ctgtttatat tgctgatttt tcatctgtta
541 atgaagaagg aacgtactat cttgcctgtc cgggagtagg aaaaagcgtt aactttaaaa
601 ttgcaatgaa tgtatatgag gatgctttta aaacagcaat gctgggaatg tattgtctgc
661 gctgcggcac cagtgtgtcg gccacataca acggaatata ctattcccat ggacccgtgc
721 atactaatga tgcattctt gatttatata acggaacaga tactaaaaaa gacagtacaa
781 aaggctggca tgatgcgggc gactacacaa aatatgtggt aaacgcgggc ataacgggtg
841 gttcaatggt cctggcgtgg gacatcttta aagccagtt ggagcctgtg gcattggaga
901 ttcccgaaaa gaacaattca ataccggatt ttcttgatga attaaatat gagatagact
961 ggattcttac catgcaatca cctgacggga gcggaagggt gactcataaa gtttcgacaa
1021 ggaacttttg cggctttatc atgcctgaga acgaacacga cgaagattt ttctgtccct
1081 ggagcagtg cgaacggca gactttgttg ccatgacggc catggctgca agaatattca
1141 ggccttatga tctcaatat gctgaaaaat gtataaatgc ggcaaaagta agctatgagt
1201 ttttgaagaa caatcctgag aatgtttttg caaacagag tggattctca acaggagaat
1261 atgcactgt cagtgtgca gatgacagat tvtggcggc ggctgaatg tgggagacc
1321 tgggagatga agaatacctt agagattttg aaaacagggc ggcgcaattc tcgaaaaaaa
1381 tagaagcoga ttttgactgg gataatgttg caaacttagg tatgtttaca tatcttttgt
1441 cagaaaagacc gggcaagaat cctgctttgg tgcagtcaat aaaggatagt ctctttoca
1501 ctgcgattc aattgtgagg accagccaaa accatggcta tggcagaacc ctgtgtacaa
1561 catattactg gggatgcac gccacgggtg taagacagac tatgatact caggttgoga
1621 acaagatttc acccaacaat gattatgtaa atgctgctct cagtgcgatt tcacatgtat
1681 ttggaagaaa ctattacaac aggtcttatg taacagggct tggatataat cctcctatga
1741 atcctcatga cagacgttca gggcctgacg gaatatggga gccgtggccc ggttacttg
1801 taggaggagg atggcccgga ccgaaggatt ggggtggatat tcaggacagt tatcagacca
1861 atgaaaattgc tataaactgg aatgcggcat tgattttatg ccttgccgga ttgtcaact
1921 ataattctct tcaaaatgaa gtactgtacg gagatgtgaa tgatgacgga aaagtaaaact
1981 ccaactgactt gaacttttta aaaagatatg ttcttaaaag cgtctcaact ctccctctct
2041 ccaaaagctga aaagaaacga gatgtaaatc gtgacggaag agttaattcc agtgatgtca
2101 caactatttc aagataattg ataagggtaa tcgagaaatt accaataaaa attctgataa
2161 atattgataa acactaatat ataagtgttt aatcggtaaa agayccctgt ggcacaaact
2221 gccgcaggct gtttttatca attccggcgc agacgaaaaa agcagacgta aatattaatt
2281 actgaa

```

Polipeptídeo de celD

```

MSRMTLKSSMKRVLSLLIAVVFSLTGVFPGLIETKVSAAKI
TENYQFDSRIKLSIGFIPNHSKATIAANCSTFYVVKEDGTIVYTGATSMFNDTK
ETVYIADESSVNEEGTYLLAVPGVGSVNFKIAMNVYEDAEKTAMLGMYLLRCGTSVS
ATYNGIHYSHGPCHTNDAYLDYINGQHTKKDSTKGWHDAGDYNKYVYNAGITVGSMEF
AWEHFKDQLEPVALEIPEKNNSIPDFLDELKYEIDWILTMQYPDGSGRVAHKVSTRNE
GGFIMPENEHDERFFVPWSAATADFVAMTAMAARI FRPYDPQYAEKICINAAKVSYEF
LKNNPANVEANQSGFSTGEYATVSDADRLMAAEMMETLGDDEYLRDENRAAQFSK
KIEADFDWNVANLGMFTYLLSERPGKNPALVQSIKDSLLSTADSIVRTSQNHGYGRT
LGTTYWGCNGTVVRQTMILQVANKISPNDYVNAALDAISHVFGNYYNRSYVTGLG
INPPMNPDDRSGADGIWEPWPGYLVGGGWPGPKDWVCIQDSYQTNEIAINWNAALIY
ALAGFVYNNSPQNEVLYGDVNDGKVNSTDILTLLKRYVLKAVSTLFSKAEKNADVNR
DGRVNSDVTILSRYLIRVIEKLPI

```

csI (Trichoderma reesei)

```

1 tggccaaatc gtgatcgatt gatactcgca tctataagat ggcacagatc gactcttgat
61 tcacagacat cgtcagccc tcaagccgtt tgcaagtcca caaacacaag cacaagcata
121 gcgtcgcaat gaagttcctt caagtccctc ctgccctcat accggccggc ctggcccaaa
181 ccagctgtga ccagtgggca accttcactg gcaacggcta cacagtcagc aacaaccttt
241 ggggagcatc agccggctct ggaattggct gcgtgacggc ggtatcgctc agcggcgggg
301 cctcctggca cgcagactgg cagtgggtcg gcggccagaa caacgtcaag togtaccaga
361 actctcagat tgccattccc cagaagagga ccgtcaacag catcagcagc atgcccacca
421 ctgcacagct gagctacagc gggagcaaca tccgcgctaa tgttcgctat gacttggtca

```

```

481 ccgcagccaa ccgaatcat gtcacgtact cgggagacta cgaactcatg atctggtaag
541 ccataaagaag tgaccctcct tgatagtctt gactaacaac atgtctttag gcttggcaaa
601 tacggcgata ttgggcgat ttgggtcctca cagggaaacag tcaacgtcgg tggccagagc
661 tggacgctct actatggcta caacggagcc atgcaagtct attcctttgt ggccagagcc
721 aacactacca actacagcgg agatgtcaag aacttcttca attatctcgg agacaataaa
781 ggatacaacg ctgcaggcca atatgttctt agtaagtca cctcactgtg actgggctga
841 gtttgttgca acgtttgcta acaaaacctt cytataggct accaatttgg taccagagcc
901 ttcacgggca gtggaactct gaacgtcgca tctcggaccg catctatcaa ctaaaaacctg
961 gaaacgtgag atgtggtggg catacgttat tgagcagggg aaaaaaagca ttggatcc

```

Polipeptideo de egI

```

MKFLQVLPAIPALACTSCDQWATFTGNGYTVSNLWASAGS
GFGCVTVAVSLSGGASWHADWQWSGGQNNVKSQNSQIAIPQKRTVNSISSMPTTASWS
YSGSNIRANVAYDLFTAANPNHVTYSGDYELMIWLKGYDIDGFIGSSCGTVNVGGQSW
TLYYGNGAMQVYSFVAQTNTTNYSGDVKNFFNYLRDNKGYNAAGQYVLSYQGTTEF
TGSSTLNVASWTASIN

```

egI 1 (Trichoderma reesei)

```

1 ttgtcccaaa atggggccct cagttacact gccgttgacc accggccatcc tggccattgc
61 ccggctcgtc gccgccacgc aaccgggtac cagcaccccc gaggtccatc ccaagttgac
121 aacctacaaq tgtacaaagt ccgggggggtg cgtggccacg gacacctcgg tggctcctga
181 ctggaaactac cgtcggatgc accagcgaaa ctacaactcg tgcaccgtca accggcgctg
241 caacaccacg ctctgccctg accaggcgac ctgtggcaag aactgcttca tcgagggcgt
301 cgactacguc gctcggggcg tcacgacctc gggcagcagc ctuaccatga accagtacat
361 gccacagcag tctggcggtc acagcagcgt ctctcctcgg ctgtatctcc tggactctga
421 cggtgagtag ctgatcctga agctcaacgg ccaggagctg agcttcgacg tcgacctctc
481 tgctctgcgg tgtggagaga accgctcgtc ctacctgtct cagatggacg agaacggggg
541 cgcacaacag tataacacgc ccgttgccaa ctacgggagc ggtactatgc atgctcagtg
601 ccccgctccg acatggagga accggcaccct caacactagc caccagggct tctgtctgaa
661 cagatggtgat atcctggagg gcaactcgag gggaatgccc ttgaccctcc actcttgcac
721 ggccaacggc tggcactctg ccggttgccg ctcaacccc tatggcagcg gctacaaaag
781 gtgagcctga tgcactact acccctttcc tggcgctctc gcggttttcc atgctgacat
841 ggttttccag ctactacggc ccgggagata ccgttgacac ctccaagacc ttccacctca
901 tcaaccaagt caacaacgac aacggctcgc cctcgggcaa cttgtgagc atcaacggca
961 agtaccagca aaacggcgct gacatcccca gcccccagcc cggcgccgac accatctcgt
1021 cctgcccgte cgcctcagcc tacggcgccc tggccaccat gggcaaggcc ctgagcagcg
1081 gcatggtgct cgtgttcagc atttggaaag acaacagcca gtaactgaac tggctcgaca
1141 cggcgaaacg cggcccttgc agcagcaacg agggcaaccc atccaacatc ctggccaaca
1201 accccaacac gcaactcgtc ttctccaaca tccgctgggg agacattggg tctactacga
1261 actcgactga gcccccgcgc ccgcttgcgt ccagcaagac gttttgact acaaggagga
1321 gctcagagac ttccagcagc ccgagctgca ccgagaetca ctggggcgag tgcggtgga
1381 ttggttacag cgggtgcaag acgtgcaagt cgggcaactac gtgacagtat agcaacgact
1441 gttcgtatcc ccatgcctga cgggagtgat tttgagatgc taaccgctaa aatacagact
1501 actcgcaatg ctttagagc gttgact

```

Polipeptideo de egII

```

MAPSVTLPLTTAILAIARLVAAQPGTSTPEVHEKLTTYKCTKS
GGCVAQDTSUVLDWNYRMMHDANYNSCTVNGGVNTILCPDEATCGKNCFIEGVVYAAS
GVTTSGSSLTMNQYMFSSGGYSSVSFRLYLLSDGEYVMLKLNQJELSPFDVLSALP
CGENGSLYLSQMDENGGANQYNTAGANYGSGYCDACQFVQVTRNGTLNTHSQGFCCNE
MDILEGNSRANALTFBSCATACDSAGCGFNPGSGYKSYGPGDTVDTSKFTFTITQ
FNTDNGSPSGNLVITRKYQNGVDIFSAQPGGDTISSCPSASAYGGLATMKALSSG
MVLVFSIWNDSQYMNWLDGNGAGPCSTEGNPSNLANPNTHVVFNSNRWGDIGST
TNSTAPPPPPASSTTFSTTRRSSTSSSPSCTQTHWGCQGGIGYSGCKTCTSGTTCQY
SNDYYSCQL

```

celO (Clostridium thermocellum)

```

1 gatcttaaaq gtataacatg gagcggaaaa aaatttgctg tcgcaggtac gaatatcata
61 ttatcttccg aaaacggaat cagctggaat gccgttgaaq ttaatgccat tcttcatgac
121 attgcttttg gcaacggaat atttgacgcc gtcggttatg accggttatc atgtcttctg
181 tggatggaga acattgggaa acaaaagtgt aagcttttgc ttatgatttg actaatatag
241 tgtggtacga taacaaattt attgccattg gttcaggcag tadaccctcc atagtgtgat
301 ccggggagcg aaaaaagtgt gttgcaagag gtccaaaaga tgcctcttac aagtggtgact
361 cctctttgca taacgtggaa tggcgaaaaa ctggttgcaq ccggctacga cagtactatt
421 ctgacccgcg tgccaaaaga tatagttaaa gtgaaggtga atgacagacc catagtattt

```

```

481 gatgtggcgc caataatcgg tgaaggaaga acactgggtgc ctctcaggca catcttcgaa
541 gccctgggag cagaagtata atgggatgca tcaaccagaa cagtaaccgg aatcaaaagt
601 tcggacaaga ttatáctgaa aattgacagc aaagaagccc ttgtaaacgg tgaacaacaaa
661 gagctggatg tacctgcaac tatagtaaac ggaaggacac ttgtaacctg aaggtttatt
721 tcggaaagct tgggcgcoga agtttcatgg gatgataatt caaaaaccgt cataattaaa
781 acaaacctct aatgaaagca acactattat tcataácttg cttttagcat cagaagcctt
841 tgctgacaat aaattttata aaaccaacgg cttcagataa ctctttcatt gcaaggtttt
901 aggacccatt ttctgtctga aaatactata ttaacacaca gtgataatga tataattaaa
961 atagcacatg tttttttatt tacacaattt ttgtttttat ttttccataa tttatggagt
1021 tggggagggt agttttaatg ggtcaaaaac attttaaaag aagtcgttg tctgtattaa
1081 caatttcagc cctgattatc tctgtccttt tcagttttat ttctgttaac gcagatgaca
1141 cttctgaaga acccgctttg gaaggcctgt ctatacacta tatggacggc acactggacg
1201 taagaatatc gagcatcgt ccttaacataa ttattccataa caacagcggc atggatgtgg
1261 acatggcoga ccttagggta aggtattact acgaaaaaga ggggtgtacc gaagaagtc
1321 ttacatgctt ttatacagca ataggtgcgg acaaaatatt tgcgcaattt catcccgagc
1381 tgggatacgc tgaatccggc tttaaccagt atgcgggaat tataaaaagc ggtggcaca
1441 ggcggcagct gcagctggta ctgaaaaaaa tatcgaaagg ttaactcga ccaagcaatg
1501 attattctta tgacccaagt tacactgatt atgcagaata tgataaaata acactctatt
1561 acaaaagtaa actggtatgg ggaagaaga gacctcctcc tccaccggaa ccgaaccctc
1621 ccgcaaacaa cgcgcactgg ctctcatgtg agggaaatct aatcaaggat gccaggggaa
1681 ataccgttta tcttaacaga atcaactggg ttggatttga aactgacgga gcaaacgggt
1741 ttcacggcct taacaaatgc aaccttgagg attctcttga tttaatggca aaattagggt
1801 tcaatattct cagaatcccc atcagtgctg aaattattct gcaatggaaa aacggcgaa
1861 tggtagaauu ttcttttga aacacctatg aaaaaccggc tcttgacggc ctacagcgtc
1921 ttgaaatatt ggactataca ataaatcaca tgaagaaaaa cgggtatgaa gccatgattg
1981 acatgcaacg ttcaacccag gactcatacc aggaaaacct ctggtataac aaggatataa
2041 ccatgggaag atttatcgaa gccctggaat ggattgtcga aagatacaag gacgatgata
2101 cggtcattgc ggtagatctt aaaaatgaac ctcatggaaa gtactccggt ccgaatatcg
2161 ccaaatggga tgattogaat gaccggaaca actggaagag agcagctgaa atcattgccc
2221 aagaaattct tgcaatcaat ccaaatcttt taatcgtcgt agaggggtgt gaggcatacc
2281 cgatgggaag gtatgattac accaactcgg gtgagtttac cactactgt aactgggtgg
2341 gcggaattt aagaggagt gccgaccatc ctgttgtcat atccgctcgg gacaagctcg
2401 tatattcctg acatgattac ggaccggaca tctatatgca gccgtgggtt aaaaaagatt
2461 tcgacattaa caccctttat gaggaatgct ggtaccacaa ctgggtactac attgtcgagc
2521 aaaatattgc gccatgttta atcggcgaat ggggaggcaa gcttatcaat gaaaacaaac
2581 ggaagtggct tgaatgtttg gctaccttta ttgcagaaaa gaaactgcat catacctctt
2641 gggcttttaa tcccaactca gccgacacgg gcggtctaat gcttgaggat tggaaaaocg
2701 tggatggaga aaaatatgca ataattgtgc ccacattgtg gaagaaaggt ctggtactatg
2761 taataccgct gggagggaatt acggaggata cctttaaata tgggtgacgtt aacgggtatt
2821 ttgcogtaaa ctccaaacgc cttaacattga taaaacogta cgtccttaaa aatattgacg
2881 aattccctcc tcctcatgga ttgaaagctg ccgacgtgga cggaaatgaa aaaataacct
2941 ccagtgatgc tgcctttgta aaaaagtgac ttctaaagac cataacatca ttcccggtgg
3001 aagaaaacca aaatgaaata ttagaataaa atcattaatc taaaagctg tggaaaatgc
3061 aactccaca agttttttta cttatttttt atacgcattt tcaggcttca ttcaaaaatt
3121 tttcaaatgg caacattact tttttttatc ctgctgtctt tctgtgattt aacaattctt
3181 tggcctggaa taataatatt gtatggtcgc caaagcaatt gccgagacta taggcacaaa
3241 ccacgtatat ttgcctgtgt tgcctcctgt caggttcttt tggctgtcct ctgaagaatc
3301 cgaagaagta ttgtcgggat ttgcgacaa caccacatct gcgcacatcg gtacgttact
3361 cactttctcc agcatcacat tgtcgaatga agcttttccg gtattcaaat taccatctcc
3421 gcccaaaccc aaagacactt ttatcgtctc tacattctca ccagttttaa tatacaactc
3481 agtgtattgc cattcatcaa cagtacctct tatatctttt gaatatgtag taactccttc
3541 caaagacaag ttctgtccca aaacatcgtt gccacattt tcagttttaa tccagcctga
3601 aagtttgtta tatgagttcg ggcgtgacgt cacttcttga agatatcttg catctcttgc
3661 ctctctattc tcaatagtaa catagtactg ccgcttttga gcaacttctt gctccacttt
3721 aaactcgaca acaccgttct gataattcca aaccatgta ctccagccaa caggcatatt
3781 attatccact tcttcaaaag acggattttt taataaaatt tccgcgcgca atccccactg
3841 acaagcagc atactaaaca gcaagcaga agcaacagc aggtg

```

Proteína de Cel0

```

MQQKHKRSLSLVLTISALIIISCLFSFIEVNADTSEEPALGL
SIHYMDGTLQVKYQSMRPYIIHNNSGMDVDMADLRVRYYYEKEGVTEVLTCTFYTAI
GADKIFAEFHPPELGYAEIGFTSDAGIIKSGGNSGQLQLVLKKISNGYYDQSNDSYDP
SYTDYAEYDKITLYYKGLVWGKEGPPPPPEPTPPPNNDWLHVEGNLIKDAQGNTVY
LTGINWFGFETDGANGFHLNKNLSDSLDLMAKLGFNILRIPISAEIILQWKNGERV
ETSFVNTYENPRDLGLSSLEILDYTNHMKKNGMKAMIDMHSSTKDSYQENLWYNKDI
TMEEFIEAWKWIERYKDDDTVIAVCLKNEPHGKYSGFNIAKWDSNDFNNWKRAAEI
IAEEILAINPNLLIVVEGVEAYPMEGYDYTNCGEFTTYCNWGGNLRGVADHPVVIS
EDKLVSVDHYGFDIYMQPWFKKDFDINTLYEECYPNWYIIVEQNIAPMLIGEWGK
LINENNRKWLLECLATFIAEKKLHHTFWAFNPNNSADTGGIMLEDWKTVDDEERYAIIIVT
LWKKGLDHVIFLGGITEDTFKYGDVNGDFAVNSNDLTLIKRYVLKNIDEFPSPHGLKA
ADV DGNK EITSSDAALVKRYVLRAITSFVEENQNE

```

pclA (Fusarium solani)

```

1 caatcatcat catgaagttc actgctgctt tctgtctgtc cctcgttggc accagctctg
61 ctgcgcgtcac caagactctc cccaagagtg ctgggtgtac ttccttccc actgcccgttc
121 ctgtcaaggg cagctacgat ggtggcatga agcgatttga gcgagagccc aaagtctgca
181 aggggtcagga tgagactggt gagaaggatg ccatgttcat tcttgagaat ggtgccaccc
241 tctccaaagt tatcatttgt gcttcccagg ccgagggtgt tcactgcaag ggaactttgca
301 ctctcaacaa tgtctgtgtg gccgatgtct gtgaggatgc tgtcactctc aagcagacca
361 gcggaacctc ttacatcaac ggtggtggtg ctttccacgc ctctgacaag atcattcagt
421 tcaacggccg cggaaacctc cagctcaagg acttctacgc cgaaggactac ggaagctctc
481 ccgcgcagctg cggaaactgc aaggacaaag gtggcccccg caacgtcatc gtgcagaact
541 ctgtcgcgctg cgatggcggt gtctctctgc gcatacaac caactacggc gacacctgca
601 aggtcatcaa ctcttgccag gacaaggcca agtactgca cgcctacgag ggcaactcta
661 gcggcaaggga gctacccaag attggctctg gccctgatgg caagtactgc actgttactg
721 gctccaccac gagctgctaa gcacgtgcgc ttgatgggag atgagatgag atgatgatta
781 tcttctgtgt acgatatttg atgaaattcg gtttctcgag tttagcaact agcattttag
841 tgcactgatg tgatatttga tgtgaataaa acaagtgcata tagg

```

Polipeptideo de pela

```

MKFTAALVFAALVGTSSAAVTKTLPKSAGATSFPTAVPVKGSYDG
GMKRFEREPKVKCGQDETGEKDAMFIEENGATLSNVIIGASQAEGVHKGTCTLNNVW
WADVCEDAVILKQTSYINGGGAFHASKIIQFNGRGTVHVKDFYAEYDKLRSQC
GNCKDNSSGPRNIVENSVAVDGGVLCGINTNYGDTCKVINSQQDKGKYCDRYEGNSSG
KEPTKIGSSPDGKYCTVTGSTTSC

```

pel B (Fusarium solani)

```

1 tctagactca ttatccgtaa agacattaga taacagcttg ctacagttat ctcccctaac
61 agatcctgccc gtactcata tttgcattgga ctctacctgt aacactagcc tctctccttt
121 atcacttgag acgqccatgt tattatatga tcaqctacct caaacaaccc tgatttttaq
181 cttactctct agcaccttgt ctaggaaataa ccatcaacggt aacctgatcc cggcgacccg
241 ggggtgggtg tgcgccaccg acatgggaac atctcggacg ggcgcacccc atacaaaagg
301 gactgttaagg cgtggatctc gggacatgat ccattgaaagg caaggtgcaag cactcgggaag
361 aaatccaggg gtccgttccg tgatgttgct acgctggact ggcgcgaacta ccgaaagttaa
421 ggggtcccag ccattcccat ggggcgtgtc tgcttgttaa ccgtattttg aagcactctga
481 ctttaaggta atacagaggt gttaagcccc agtatgtttc taggaactatc ctagaataag
541 atgttaagaa gaaaaggggc aggcagtcag tagtagatgt tgaaggctgc gcttgttgaa
601 cgggagtata ccaagcaaat ccggtagatc gactaatacg tcatcgggg taccagacgg
661 attttactcc ccgtctccgt gatctatact gctgttggtt ctaaaaactc ggcaaacatt
721 cataaggctg atccccatgc ccggctccat ctgcctctgc cttgccagtc agtgccggcc
781 aatggagctc tgtggadatg aatagccctg ctgcagcagt gacagtgtgt ctacatgcct
841 caccgcttga ccgactcggg ttccgtccag ctcatccttg caacggcgga ataatctctc
901 cattggggag gtggccttct ggaataggac catgtaacag tattttgggt gccaaaggtgt
961 cagaatcgcc ccgaataggt acacacacct tgacagttcg gcgacgtagt gattctccgg
1021 gatttgcatg tcaactccgc actacacccg caaggacctg gaagcatccg gctcctcggc
1081 gtttgtcgag tagtgaacaa ccgagaagcg gtccaatcta tcatcccaac ctccaggaac
1141 accaggtata aaagggtagc caagtctctc cctaaacaac tcccttcattc catcaccatc
1201 acgcactcaa tcaaacacca ctcaagctcaa ctctcaagct caactcaatc accatgaagg
1261 cctccgctct catcatcgcc gccgtcaact ggcctctctg tgcctgcaat acogttctctc
1321 ccgcttccgc cgggttccag agcgaaccca ctgccatccc ogttcgcagg ggagacaagt
1381 acaatgggtg catgaagcga ttctgtgcga accgttaagt aagccggaaa caacagttctg
1441 actgtcataa caacctccgc tgctaacatc catttccggc tttageccac acttgcaagg
1501 accagtatga gactgttga aaggagccct ccttcattct cgaaggacggg gccactctctc
1561 ccaacgtcat catcgaccgc tcttccgggt aggggttctc ctgcaagggc acttggttaag
1621 tcaetatctc actagcctct acacccaac taacacatcc atcagcaccc tgaacaacgt
1681 ctgttgggcc gatgtctgc aggcgcggc gaccttcaaa cagaagttctg gtacctccac
1741 catcaacggg gtgtgtgctt tcagcgccca ggacaaggtc ctccagttca acggccggcg
1801 cactctgaac gtcaacgaat tctacgtcca ggattacggc aagctgggtc gcaactcggg
1861 caactcgag ggcaacggcg gccccgggaa catcaacatc aaggcggttg tgcgaagaa
1921 cgggtggcag ctctgcggcg tcaacacaa ctacggcgat gcttgcaaca tcaacgactc
1981 ttgcagaaac aagggcaaga gctgccaggc ctacactggt aacgaccaga agaaggagcc
2041 ccccaagttc ggcgcccgct gcgacaacgg caagtcttgc ctgctcaaga gctcgcgac
2101 caactgtctg atggctctgc tagctttgac aggcgggtgt gaactctgac ttcaggggag
2161 gctttctcac gaggggagaga ccagtcactg attgatgatt gtgtgtgta tcttaagtt
2221 gtcaattcta tgggtactag ctggatcggg agctagagag ggaaaaaag catagggagt
2281 atagttcttg tgtgtacata tttagacaga tagtatataa aatgtgggtt tcatgggaac
2341 gctcttgccc cttgggtctt tcaattaccc atttaactgt gaacctgttc attggagcat
2401 aggaacaaa ccttcagttc tctggctcag ttatcccatc aaggggcagg cttcaactag
2461 agtaaaaga acaatatcga cacatcatag catcatatcc caatgcttaa acagtgccct
2521 tttgtttagt cttttagctg cctacagtta aagactcata ccaaggtggg aatacatact
2581 tcaagagggc tctaggctca ccgacstgac aacatcctgt cataccctgt cgcgacatgt
2641 gtcgac

```

Poliptideo de pelB

MKASALIIAAVTGASAAVTVLPASAGVQSEPTAIPVRKGDKN
 GGMKRFVRNPPTCKDQYETGEKDAFILEDGATLSNVIIDRSSGEGVHCRTCTLNIV
 WWDVCEDAATFKQKSGTSTINGGAFSAQDKVLQFNGRGTLNVNDFVVDYGLKVRN
 CGNCEGNGGPRNINIKGVVAKNGGRLCGVNHNYGDVCTITDSCQNKKGKSCQAYTGNDQ
 KKEPPKEGPAGDNGKSLVKSRLTNC

pelD (Fusarium solani)

1 aagcttattt ctactcttag tgggtggaat actgtcccg ggatcctcac agagtaaaac
 61 agaaacacgg ccgtgccaag agttcttccg ccgtgtccct tcgcccagac tggagattgc
 121 tgcggagcaa agcccccgg ggaggacoga taggcacggg acacgatggc tgaacgagga
 181 gccatcgtgc gatacogaca gtccggaggg tcgatataaa gatgtgtgaa tgtcgcctcg
 241 atagcttttg attcagcact caactcaacg cactctcacc aatccattca cttgccttgc
 301 tcttcaacca ctcaaccaac aacctcactt cttctacaac cggcaacatg cactgtccca
 361 gcatcgtcac tgtcctcgcc gccctcccg cggccatggc ttgcctcggc tacaccgggtg
 421 gtgttcccaa ggctactggc agcaagtctc tgagcgccc caagaccctc aagaagggtg
 481 aggttttcca tgcgggtgg gtccggtaag accgtggtgt gaagtgtctt ggtcaggtg
 541 aggtgtgtaa gttgtcactt ctctgaaaac ttcaagcagg aggtttataat tccactctca
 601 ggttccaaag acgcgtctt catctcgag gagggtgcca ctctccgcaa cgtcatcctc
 661 ggtgccaaac agcgtgaggg tatccactgc aagggtcctt gcaacatoga gttcgcctgg
 721 ttcgaggtg tctgcgagga tgcctatctc atccttggca cgggcactgc caacatcctc
 781 ggtgtgtgtg cttaaccaag ctccgacaag gtcactcagg acaacgggtt cgggtcaggtc
 841 aacattgtca acttctacgc caacgactac ggcaaggctt accgatcttg cgttaactgc
 901 aagggcacaa ccaactgcaa cgcctccgtg cacatggagg gcaacacggc cgtcaagggt
 961 ggtgagctca ttggcatcaa caccaactac ggtgacaagg ccacctactc caaacaactgc
 1021 taccaccaag cccagtgcca gggttacaag ggtgcgaca agtccaaagg cagtgccagg
 1081 cctcccaagg ccgcacaagg ctataatggt cgttgacggg cagtgccgtt tgaattgttc
 1141 gtttttaatt ttctttgata cgtttgcccg cacttatgta tctgtttata cactatagag
 1201 tgggtggatg ctacctgtac atattacctt agcgaagtac ataaaaagag ttgagcaggc
 1261 ttggtctctg gtgtgtctaa gatgttttca ctgatattg caatgtggcc cagttataaa
 1321 ttgttcttgt tccactggga tgaatggcga ctgcaactag agctctcacc gcccctccct
 1381 tccgtgctat tgaactccct ctacttgaat taacgggat

Poliptideo de pelD

MHAPSIVTVLALPAAMACLGYTGVPKATGSKSLSAEPTLKKG
 EVFDAGWVRVDRGVKCSGQAEKSKDAVFILEGATLRNVIIGANQREGIHCKGSCNI
 EFAWFEDVCEDAISILSGGTANIIGGAYHASKVIQHNGCGHVNINFTYANDYGVY
 RSCGNCKGNTNCKRSVHMEGTAVKGGELIGINTNYGDKATYSNNCPKTCQCYKKG
 DKSKGECEPSKAACK

cutinase (Fusarium solani)

1 agtggaaagg gagccgtgtg gaggcacaag aagctgaaaa aaccgaggtc aaaaagacctg
 61 ctgaatagtt tctcactgag atgagatggg aacggcatga aatcttgggc cttattctga
 121 caccatcgcc tcttctctgg tacgccttgc atcaaaagag agggttctac cccctaaaag
 181 cacagctcga atgaaattcc catttgagta gatccaaaga tgctccgtgt ttctctagggt
 241 tgggtagga ggttgacca cccatgata ggggcagggt caggtaggtc ggtaaaatc
 301 agagccgctg attttcggaat gaacgagtc aagcttggca tgatctgttg atctcaaaac
 361 cctccaatca cgttaaaag gcactcgtaa aagtctctcg atgctctccc accatcaggt
 421 aggtggtgtc tatgcgcgtc ctgacactct tcgcaagggt taacagaata ggcaaaaggc
 481 ccttcccgag gtttcatctc taaaaccaaa ctacgccttg tcaaaagtac agctgaacag
 541 ccgatattcg ctgattgggc tcttctatgt ttgcgggaac gttccatcta cgggtttagc
 601 gatcggcag ggttgcaact agaagcggaa gagcttgcgg ggagggggcac ggggtggttt
 661 cctgaagcga ctagggttgc tgaacctatc acgactcata gctgcgagcg catggtccag
 721 tatcaagagt tttgacgtcc tttgatgaaa actgccccto tcttgacgct agaaacogag
 781 gaaatggatc gogagccgag gctcgttttc agagcttggg cgtatgatag ttcatctgtt
 841 caagcttaaa tatcgttgtt ccagaccact gggaaacggaa ccagacaacc acacatacct
 901 tcaacttcat aacattcact tcaactcttc gctctctctt ttctactctt tctactctc
 961 accatgaaat tcttctctct caccacactt ctgcgcgcca cggctctgga tctgactact
 1021 tctaaacctg cccaggaagt tgaagcgccg cagcttggta gaacaactcg cgaagatctg
 1081 atcaacggca atagcgcttc ctgcgcgcat gtcacttcca tttatgccc aggttcaaca
 1141 gagacgggca acttgggttg tagaatttct tctcatgaca acatcacctt tcttacaact
 1201 ccattagggg actctcggtc ctgacattgc ctccaaactt gactccgctt tggcaaggga
 1261 cgggtgtctg attcagggcg ttggcgggtc ctacgcagcc actcttggag acaatgctct
 1321 ccttcgcgga acctctagcg ccgcaatcag gtagatgctc ggtctcttcc agcagggcaa
 1381 caccaagtg cctgaogcga ctttgatcgc cgttggctac agccagggtg ctgcaacttg
 1441 agccgcctcc atcgaggacc tgcactcggc cattcgtgac aagatogccc gaactgttct
 1501 gttcggctac accaagaacc tacagaacgg tggccgaatc ccaactacc ctgcccagag
 1561 gaccaagggt ttctgcaata caggggatct cgtttgtact ggtagcttga tctgtgtc
 1621 acctcacttg gcttatggtc ctgatgctcg tggccctgac cctgagttcc tcatcgagaa
 1681 ggttcggggt gtcctgtggt ctgcttgagg aggtatgaaa ttttagcagg cgggctgttt
 1741 aattatggcg aggtttcag ttttctttt ggtgaatagc catgatagat tggttcaaca
 1801 ctcaatgtac tacaatggcc catagtttca aattaaagaa gcaatgaatg gtgatctaca

```

1861 tatcgctttg cccaagaagt cccaaccagg ctccatatac ctgagccagt tgagcacaaa
1921 ttctcgtgcc tctcgtcagc ttgcacaggaa aggtcagatac ataaaccggc ctgcacagac
1981 agggcgctac ctgcacagaa ttgtcccgcc aggtgtgcgc tcaaggcgaa gttcgcgat
2041 ttatagacca cctctcattc ccacatagca catctgtccc tgactcgcc tctccatcaa
2101 taacacagag attggttaca atccaggata gctcgcgac cctctttgct tgatctccgt
2161 gatactcctg ccaatcatgc actagcttca tcaagccaac aatgttgttt ttacggccgg
2221 cgttcaacct ttctcagata tcccacggg agacttgat gcggaccata tctccctctc
2281 aagatcacgg scaggttggt ttcccgagt gttggccgg gctgtggctc gaatatccgc
2341 aactaggtcg gagtcaaacg tatggtggat agtcgacag cagttctgca cctccgctt
2401 ggtctcagct gcattgcctt ttccggggtt catgaatctc cgtcggctcc ttgcagtaga
2461 ggcggtgaaa gcgcgggctt tcttttcagg gacgtagcaa gcctaaacat gctagcctga
2521 tgcggtgaaq aagaccagtt agagtgtat catgctgaag acaggcacc aagatgcgac
2581 aaagagctgc atttggtatg taaaagagat tgtctgggaa gcatatgac caggttgaag
2641 aggaagccac gtggcctttg ccgacttggg ggagagtaac gatggacoga aggtatgcca
2701 tacttctgaa aaagcaaacg cagagattat ggggtgtttg gccaaattct cctgaggaag
2761 agggagatc

```

Polipeptideo de cutinase

MKFFALTLLAATASALPTSNPAQELARQLGRITRDLINGNS

ASCADVIFIIYARGSTETGNLTGLGPSIASNLESFAGKDGWVIGVGGAYAATLGDNAL
 PRGTSAAIAREMLGLFQQANTKCPDATTIAGGYSQGAALAAASIEDLDSAIRDKIAGT
 VLFYITKLNLRGRIPNYPADRTKVFCTGDLVCTGSLIVAAPHLAYGPDARGPAPEF
 LIEKVRVRVGS

swol (Trichoderma reesei)

```

1 acatgtccgc gtctagtgt ttatatgtat aatgatcaca attcatgtaa ctgcgctttc
61 gcacatgcaa aaagccctaa cgtgagactg agccacttcc tagttttcgt atcatgtcag
121 ttgcgaaggtt acaccacaat gcagctcaac gagacaaocg tgcagcccaa taataatgga
181 tagctgggtt tagagagatt aagaagagaa tgcgttttca gaaggaaagc tatatcatag
241 cagctgctac atttccctct ttccctcttt ccctccctta atagatacgt acccttgcaa
301 ttggccggttt cggaaagat ttctgttcta tcttaaccac ctacgcccaga atacgggttg
361 aataatcagt gctcaatagg gaaccccca actgcagcat ataagccat taacaagacg
421 tcccacacag cattttcctt cagtcgcgag caggtatag agagtaggca atttacaacc
481 cacttttagc ctctgcacat atctcaccac atttgcatia cggcatccac tattacaacc
541 acttgccacg tgatggcttt gctctacca tatcggtttt tacgttccgc tgtgttcagt
601 cgtttaaacc gtggtggagc agaaccagca gcttctcgta tccgggaactc cgttatccgc
661 ataccctcag tcgaacccct cgtgatactc agcctaata acatcgcatc gtagcagaca
721 acttcagtaa tttttgtggg gcaatggtca gatcgcctct cttatatata aagcagaggt
781 tagtgggcta aggaattcg tggttcgttt atagtagagc tgtcagttgc ccttcccgaa
841 ctgttagacg ggaatggctg taagcttata ctgctggctc tagcaagcct tgtatcaact
901 tctattccagc agaattgcgc agcattatgt taagagtgtt gaggctgttg agtaaccatct
961 gtatcgttgc taacgtaggc ttttagtggc caatgtggag gcataggggt gtcgggccc
1021 acatggttgc ttgctgggc ccagtgcatg ttgtcaatg actggtaact ccaagtgcct
1081 gcgtcaacgc tatgagctcc gatccgggccc gtcaatatct tctaaactcca gactgtacag
1141 ggcggaaacc ccccaaacgg aacaacttcc tctagcttgg ttcccggaac gtcgtcagca
1201 tctcatccgc tggcctcgtc ttaccocggc ggcaactcac caactggcag tgcctccacc
1261 tacacaacca cagatacagc tacctgtggt cctcattcgc agtctccctta cccacagcatt
1321 gcgcatacca gttcggatc gtygaccctc gttgataatg ttgtctgcc atcatattgt
1381 gctaattgat acacatccga gtcattgctc ggctgcggta cctgcactac gcgcgctcgc
1441 ggggaactgca aatccggaa cagtgtacca gaggctccatc acgtatccag caacgagagc
1501 tggcactaca gtgtaagatg accaacgcgt gggatctata tctcttctct tctcgggct
1561 gctgaccttg gagcatttag agatcaacc cctttggcct aacgagcggc ggggctgtg
1621 gctttggcct gtacggtctc tgcacaaagg gcagtggtac agccagctgg agggatccca
1681 tgcctggcgc gacgtgtgac gctttttgta cagcgtatcc cctgctttgc aaagacccta
1741 ccggcactac ccttcgtggc aacttcgcag ctccaaacgg cagattactac acccaagttg
1801 gggacccoga gaggcaatca tttctggtg tagtattcac tgacagtgcc atagttctgg
1861 tctcgttgc caggagccct cagataactac ctgctcctgc gcagtgcat tgaagctgata
1921 caaacaagc ccgataggac cagattatgt gtcggagaag ccggctacac gdatccaat
1981 actctcgaga ttgtggacag ctgcctgctc agcgcgaact ccaagtgtgt ctgtcagaga
2041 gcccgctcca tccgctccat tgtactacat gcgccaacgc aatggccgtg gctaacatct
2101 cgcaggtggt ccgggcgcgc atcattgcgc agagatcgac tcaaatacg gctgtctct
2161 tctgctgac agcattcatc tgcactgtc agacattgct atgggcccgt tgcagggcaa
2221 tggatcacta accaatggcg tcatccgac tcatataga agagtccaat gccccaagt
2281 tgggaacgcc tacattttgc ttcgaaatgg cggagggcct tactattttg ctctcagggc
2341 agtcaacacc aacygacgc gctcagtcac caaaatcgag atcaagggcg cagacacoga
2401 caactgggtt gccttggtcc atgacccaaa ctatacagat acccgccac aagaacgcta
2461 tggcagttgg gtaatccac agggatcagg gccctttaa ttgctgtgtg gaattogtct
2521 gactagccca acgggggaa agattgtgaa tgaacaggcc atcaagacat tcaactctcc
2581 ggcacaggt gaccccaatt ttaactacat tgaacttggt gtcaggtta gccagaattg
2641 atggcaagca ttgggcaatg gcttctttgc tgtgggcaa tgaatgagc tagattctca
2701 atgcttcaag tatgtggtgt acgtctctgt gttatagat aggtatgctg ttaacttaaa
2761 tacacatcct ttggtacgtt g

```

Polipeptideo de swol

NAGKLLIIVALASLVLSIQNCAALFGQCGGIGNSGTTCCVAGA

QCSEVNDWYSQCLASTGGNPPNGTTS88LVSRSTSSASSSVGSSSPGGNSPTGSASTYT
 TTDTAIVAPHSQSPYPSIAASSCGWTLVDNVCCPSYCANDDTSESCEGCTTIPPS
 ADCSKSGTMYPEVHVHVSNSWHYSRSTHFGLTSGGACGFLYGLCTKGSVTASWIDPM
 LGATCDAACTAYPLLCCKDPTGTTLRGNFAAPNGDYITQFWSLSLEGALDNYLSCGECIE
 LIQTKPDGTDYAVGEAGYTDPITLIVDSQPCASNSKWCQPGADHCGEIDFKYGCPL
 PADSIHLDLSDIAMGRLLQNGSLTNGVIPTRYRRVQCPKVGNAIYLWRNGGGFYFAL
 TAVNTNPGGVTIKIBIKGADTDNWWALVHDPNNTS8RPQERYG8WVLPQ8G8PFNLPV
 GIRLTSPTGEQIVNSQAIKTFTTPATGDPNFYIIDIGVQFSQN

xyn2(Trichoderma reesei)

1 agacagcaag ctcaactgca tagtatcgac ttcaaggaaa acacgcacaa ataacatcat
 61 gggtgccttt tccagcctca tctgcgctct caccagcaco gccagtaact tggcgatgcc
 121 cacaggcctc gagcctgaga gcagtgctaa cgtccacagag cgtggcaggt acgacbtgt
 181 tcttgagctt cacaatgatt atcgccgtcg tgcctagcat aactacgacc aaactaccca
 241 aactggcgga caagtccagt attcgccctc caacactggc ttctcagtga actggaacac
 301 tcaagatgag ttgtgtgttg gcgttggttg gacgactgga tctctcgtgt aggagagctc
 361 ctcatcattc tgcactttga aagcatcttc tgaccaaagc ttctctttag tcccatcaac
 421 tttggcggtt cttttagttt caacagcgga actggcctgc ttcccgctta tggctggagc
 481 accaaccacc tgggttgagta ctacatcatg gaggacaccc acaactcccc agcacagggt
 541 accgtccagg gaacgctcac cagcgacgga gccacttaca ccatctggga gaataccggt
 601 gtcaacagac cttccatcca gggcacagcg acctcaacc agtacatttc cgtggcgacc
 661 tcgcccagga ccagcggaac tgttactgtg cagaaccact tcaatgcttg ggcctcgctt
 721 ggcctgcacc ttggcgagat gaactaccag gttgtcgtg tcgaaggctg ggttgatagt
 781 ggttctgcct cacagagtgt cagcaactag gttctgttga tgttgacttg ggttgataga

Polipeptideo de xyn2

MVAFSSLICALTSIASTLAMPTGLEPESSVNVTERGMYDFVLGA
 HNDHRRRASINIDQNYQTGGQVSYSPSNTGFSVNWNQDDFVVGWTTGSSAPINFG
 GSFSVNSGTGLLSVYGWSTNPLVEYYIMEDNHNYPACGTVKGTVTSDGATYTIMENTR
 VNPSIQGTATFNQYISVRNSPRTSGTIVTVQHNANANASLGLHLQNMNYQVVAVEGWG
 GSGSASQSVSN

axel (Trichoderma reesei)

1 cccaggttcc caccataata attcctcctg ttacaagagc caaactgcct tcagtcaaa
 61 aaacacttac tcttttgcct agccaagctt tccctgcac tggcagocca gtagatggag
 121 agacgcttgt gaagcgacaa tgcgcgcta ttcaactctt cggcgccggt gaaacgacag
 181 ttagtcaggg atatggctcg tccgctacgg ttgttaactt ggtcatccaa gcccatcccg
 241 gaacacacac cagagcaatt gtctaccgag cgtgcggttg tccagcttca tctggcgga
 301 tcaactatgc taactcagtt gtgaacggaa ccaacgcgag ggcggcgga atcaacaaat
 361 ttcaacactc ttgcgcggac actcagctgg tgttggtcgg atactcgag ggtgctcaaa
 421 tcttcgataa tgcctctcgc gaggagggcg atcctggtga aggaattacc aaactcgtg
 481 tcccccatac tgcgggagca gtttcgctg ttaagcagc aatcttcagt ggagacccct
 541 gaacacattc tggcctgccc tataacgtcg gaacctgtac taccacgggt ttcgacgccc
 601 gtccggtctg cttcgtctgt cccagcgctt ccaagatcaa gtcttactgc gatgcgcgag
 661 acccgtaact ctgcacggga aatgaaccca acgttcacca aggttacggc caggagtaacg
 721 gccagcagcc tctcgtcttc atcaacagcc agctctcctc aggcggttct caaccccggg
 781 gggcgggccc gaccagccac tccagggcca ccagcacaag aactggaagc tctcctggcc
 841 caactcagac tcaatggggt cagtgcggag gccagggctg gacgggtcct acgcaatgtg
 901 agagcggaac gaacttgccag gttatcagcc aatggtactc tcaatgcttg taaagagcat
 961 gaaggtcgag attatgggc gtttcgtagc cagctgcagt taggactagc ttggagaaat
 1021 ctacttatga tgaattgaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaa

Polipeptideo de axel

MPSVKETLTLLLSQAFATGSPVDGETVVKRQCPAIVFGARET
 TVSQGYGSSATVNLVIQAHPTTSEAIIVYACGGQASCAGGISYANSVNGTNAAAAA
 INNFHNSCPDTQLVLVGYSQGAQIFDNALCGGDPGEGITNTAVPLTAGAVSAVKA
 EMGDPRNIHGLPYNVGCTTQGFDAFAGFVCPASAKIKSYCDAADPYCTGNDPNVH
 GGYGOEYQQAALAFINSQLSSGGSQPPGGPTSTSRPTSTRTCSSPPTQTHWGCXG
 QGWTGPTQCESGTTQVSIQWYSQCL

bg11 (Trichoderma reesei)

1 cggcctcaaa tcttaaatct cgggtgtgggt agggagtcaa cgaatgggatt tggcgcaat
 61 gctgcgcagc ccgagtggtt ctgcaacggt atccaggaga ttctgcgcttg cccaagaggg
 121 agttgacggg gagagtcaca actggttctt tcagtaacgc caccctggca gactatataa
 181 cttgtggaca agactctgct ttgttgagtt ctctcaacca gtcttgacca agacattct
 241 gttgagccca atcagaatg cgttacggaa cagcagctgc gctggcactt gccactgggc
 301 cctttgtctg ggcagacagt cagtatagct ggtccatact gggatgtata tgtatctctg
 361 agacaccatg ctgactcttg aatcaaggtg gctcaacatc gggggcctcg gctgaggcag
 421 ttgtacctcc tgcagggaat ccatggggaa ccgcgtacga caaggcgaag gccgacttg
 481 caaagctcaa tctccaagat aaggtcggca tctgagcgg tgtcggtctg aacggcggtc
 541 cttgcgcttg aaacacatct cgggcctcca agatcagcta tccatcgcta tgccttcaag
 601 acggacccct cgggtgttga tactcgacag gcagcacagc ctttaacggc ggcgttcaag
 661 cggcctcgac gttggatgct aatttgatcc gcaaacgttg acagttaac ggtgaggagg
 721 tgaaggcctc ggggattcat gtcataactg gtcctgtggc tgggcgctg gaaagactc
 781 cgcagggcgg tgcgaactgg gagggtctcg gttcgtatcc atactcaag ggcattgcca
 841 tgggtcaaac catcaacggc atccagtcgg taggcgtgca ggcgacagc aagcaactata
 901 tctcaacga gcaggagctc aatcgagaaa ccatttcgag caacccagat gaccgaactc
 961 tccatgagct gtatacttg ccatttgccg acgcggttca gcccaatgct gcttctgta

```

1021 tgtgctogta caacaaggtc aataccacot gggcctgcga ggatcagtag acgctgcaga
1081 ctgtgctgaa agaccagctg gggttccag gctatgtcat gacggactgg aacgcacagc
1141 acagcactgt ccaaaagcgc aattctgggc ttgacatgtc aatgcctggc acagacttca
1201 acggtaacaa tcggctctgg ggtccagctc tcaccaatgc ggtaaatagc aatcaggtcc
1261 ccacagagcag agtcagcagat atggtgacgc gtatcctcgc cgcattgtag ttgacagggc
1321 aggaccagggc aggtatccg tcgttcaaca tcagcagaaa tgttcaagga aaccacaaga
1381 ccaatgtcag ggcaattgcc agggacggca tcgttctgct caagaaagac gccaacatcc
1441 tgcgcgtcaa gaagcccgct agcattgcgc tcgttggatc tgcgcgaatc attggtaaac
1501 acgccaagaa ctgcacctgc tgcaacgaca aaggctgcga cgcaggggac ttgggcatyg
1561 gttgggggttc cggcgcggtc aactatccgt acttctgcgc gccctacgat gccatcaata
1621 ccagagcgctc ttgcaggggc acccaggtta ccttgagcaa caccgacaac acgtcctcag
1681 gcgcactctgc agcaagagga aaggacgtcg ccactgtctt catcacgcgc gactcgggtg
1741 aaggctacat caccgtggag ggcaagcggc gcgatcgcga caactgtgat ccgtggcaga
1801 acggcaatgc cctggtccag gcggtggcgc gtgccacag caacgtcatt gttgtgtcc
1861 actccgttgg cgcactcatt ctggagcaga ttcttctctc tcgcagggc aaggcgttg
1921 tctggggcgg tcttctctct caggagagcg gcaatgcctc cgtcagcgtg ctgtggggag
1981 atgtcagccc ttctggcaga ctggtgtaca ccattgcgaa gaccccaat gactataaa
2041 ctgcctatcgt ttccggcgcc agtgacagct tcagcagagg actgttcatc gactataagc
2101 acttcagcga cgcacatata acccgcgggt accaggttcg ctatggactg tgaagtgtg
2161 ctaacctgaa caatctatta gacaggttga ctgacggatg actgtggaat gatagcttac
2221 accaagttca actactcagc cctctcctgc ttgtcagccg ccaagctcgg tctcgcgact
2281 ggggcggttg tgccgggagg ccagagtgat ctgttcacga atgtcgcgac agtcaccgtt
2341 gacatcgcaa actctggcca agtgactggt gccagggtag ccagctgta catcacctac
2401 ccactcttca caccaggaac ccctccgaag cagctcgcag gcttgcgaa gctgaaacctc
2461 acgctggtc agagcgggac agcaacgttc aacatccgac gcagagatct cagctactcg
2521 gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgcgc tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg
2581 agcagcggg atatcaggct gacgagcact ctgtcggtag cgtagcgcga ggaaggtgaa
2641 ggcggttga cgtgtag

```

Polipeptideo de bgli

```

MRYRTAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVPPAGTPWGTAY
DKAKAALAKLNLQDKVGVSVGVWNGGFCVGNTPSPASKISYPSLCLQDGLGVRYSTG
STAETPGVQAASTWDVNLIRERQDFIGEEVKASGIHVILGPVAGPLGKTPQGGRNWEG
EGVDPLYLTGIAMGQTINGIQSVGVQATAKHVILNEQLNRETISSNPDRTLHELYTW
PFADAVQANVASVMGYSYNKVNNTWACEDQYTLQTVLKDQLGFFPGYVMTDWNQHTTVQ
SANSGLDMSMPTGDFNGNRLWGPALTNVNSNQVPTSRVDDMVTRILAAWYLTGQDQ
AGYPSFPI SRNVQGNHKTNVRAIARDGIVLLKNDANI LPLKKPAJAVVGSAAIIGNH
AKNSPSCNDKCGDDGALGMWGSAGVNPYFVAPYDAINTRASSCGTQVTLSTNTDNTS
SGASAAAGKDVAIVFITADSGEGYITVEGNAGDRNNLDPMHNGNALVQAVAGANSVI
VVVHSGVAILLEQILALPQVKAVVMAGLPSQESGNALVDVLWGDVSPSGKLVYTIAS
PNDYNTRIVSGGSDSFSEGLFIDYKHFDANI TPRIEFGYGLSYTKENYRLSVLSTA
KSGPATGAVVGGPSDLEQNVATVTVDIANSQGVTCAEVAQLYITPSSAPRTPPKQL
RGEAKLNLTPQSGTATFNIRRDLSYNDTASQKWWVPSGSFGISVGAASRDRLTST
LSVA

```

Gene de mananase (Trichoderma reesei)

```

1 gcatgatgat gctctcaag agtctccttt ccgctgcaac tgcagcctca gcgctggcgc
61 cgttactgca gccctgtcca cgtgcttoga gctttgtaac catatccggc acccaattca
121 acatcgatgg caaagtaggc tactttgcgg gcaccaactg ctactgtgtc tcgttccgca
181 ccaaccacgc cyagcttgat tccaccttta gccacatctc ttctctgggc ctcaaggtag
241 tccgtgtatg gggcttcaac gacgtcaaca ccagccctc tcgccggcag atctggttcc
301 agaagctgtc cgtcaagggg tctacgatca acacgggagc tgatgggctg cagactctcg
361 actacgtagt ccagtcagcc gacgagcaca acctcaagct catcatcccg ttgcataaca
421 actggagcga ctacggcggg ataaaagcct atgtcaacgc ctttggcggc aatgcgacca
481 cctggtagac taacacggcc ccgcacaaac agtacccgaa gtacgtccag gccgtcgtca
541 gccgtacgc aaactcagc gccatctttg cgtgggagct gggcaacgag cctcgtcga
601 acgggtgcag tactgatgtg atgtttcagt gggcgacgag tgtgtccaa tatgtcaagt
661 cacttgattc gaacctatct gtgacgcttg gacagcaggg gctcgtctc agtaactggag
721 acggcgctta tccgtatact tatggcgagg gcaactgatt tgccaagaat gtaacaatca
781 agtcgcttga ctttggtagt ttccacctct atccggactc ttggggaaac aactacactt
841 ggggcaatg ctggattcag actcatccgc ccgcttggtt agcagcagc aacacttgcg
901 tgtttgaaga atacggcgca cagcaaaacc cctgcaccaa cgaaggcacc tggcaacaa
961 cctctctcac gactcggcgc atgggtggcg acatgttttg gcagtgggga gacaattttg
1021 ccaacgggtg ccagtcgaac agtgaccctg acacgctctg gtacaaactc tcgaactggc
1081 aatgccttgg caagaacac gttgatgcta ttacggcggc tacaaacctc cctcctcccg
1141 tatcatcgac gacgacaaac tcgtctagga cctcgtcgac gccctccacc cctgggggca
1201 gctgctcgcc cttgtatggc cagtgtagag gttctggata cactggtccc acgtgctgtg
1261 cgcaggggac ttgtatatat tccaaactact ggtactcgca atgcctgaat acatgaacgg
1321 cctggagagc caggtgtatc agacagaagg agaaggagaa ggcctcttta tataagatgt
1381 cgttagcttc caccaactct taagtctgtt ttgtctaga

```

Polipeptideo de mananase

```

MMMLSKLLSAAATAAALAALVLPVPRASSFVTISGTQFNIDGK
VGYFAGTNCYWCFLTNHADVDSTFHHSSGLKVVVRVWGFNDVNTQSPSPGQIWFQKL
SATGSTINTGADGLQTLDYVVSABQHNLKLIIPFVNNWSDYGGINAYVNAFEGGNATT
WYNTAAQTQYRKYVQAVVSRVNSTAIFAWELGNEPRCNGCSTDVIVQWATSVSQYV

```

KSLDSNHLVLTGDEGLGLSTGDGAYPYTYEGTDFAKNVQIKSLDFGTFHLYPDSWGT
 NYTWGNWNIQTAAACLAAGKPCVFBSYGAQONPCTNEAPWQTTSLTTRMGSGDMFWQ
 WGDTFANGAQSNDPPTVWYNSSNWQCLVKNHVDALNGGTTTPPFVSSSTTTSSRTSS
 TPPPPGGSCSPLYGQCQGGSGYTGPTCCAGGTCLISNYWYSQCLNT

abfi (Trichoderma reesei)

1 atttgactac tctgctacag tggctattga agctttctcg cccaagttca gactttttctt
 61 acgagcctgc cttgctttga agtttttgc cctggcatta caatgctctc caacgctcgt
 121 atcatcgag cgggctgtat tggctgagcc tctctcgttg ctgctgggac tttgacatc
 181 tactcctcgg ggggaacgcc ttgctgtgac gccacacaga ccaactcgag cctgttcacg
 241 gcttatacgg gcccggtata ccaggtaaaag cgggctctcg atggtgcccac aeccgccata
 301 tcgcccctct caagtgggtg ggcacaagct gccgctcaa gctgtttctg tgggggaact
 361 acatgcctca ttaccatcat atacgaccag tcgggtcgcg gcaaccatct cccccaggc
 421 ccgcccggcg gcttcagcgg ccgggaatcc aacggctatg acaacctgac tagtgcaatt
 481 ggggcccggg taacactcaa cggccagaag gcttatggag ttttctgtgc tccaggaaag
 541 ggttatcgga ataacgctgc cagcggcaca gccaaaggag atgcccggga gggcactgat
 601 ggggtttctg atggatcaca ctacaacggc gcttgcctgc ttgactatgg caacgctcgt
 661 acaaacagcc gogatacagg caacggtcat atggaggcca tctatttttg cgcacagcat
 721 gtctggggta ctggctcagg caagggtcgg tggatcatgg ctgactcaga gaacggcttg
 781 ttctcaggct ccaactccgg caacaatgcc ggtgatccgt ccatctccta ccggttcctc
 841 actgcagcga tcaaggggca gccaaaccac tgggcaatcc gtggcggaac tggctgctg
 901 ggtcgcgtgt caactttcta cagcggcgct cggccacaag tctccgata caatccgatg
 961 agcaaaagag ggcacatcat tctcggcatt ggcgggacac acagcaacgg cggccaggc
 1021 acattctatg agggcgctcat gacctctgga tatccttcgg atgcaacaga gaattcagtg
 1081 caagccaaca tctgactgac cagatatgcc gtgcggcgcc tgacaagtgg tctgcccctc
 1141 accgtcgtgt cgtcaatctc tctacgagcc acaacagcct gctgcacgac tctgctacac
 1201 gctcatagcg ggtctaacgt caacaaccac gtgcttctat catccagcgc caacgcccct
 1261 aagcaacagg ccagctggac ggttctgtgc ggcctggcaa ataacgcttg cttctcgttt
 1321 gagtccaggg acacgtcggg cagctacatt cggcactcca acttcggtct tgtgttgagt
 1381 gccaatgatg cagataagct ctttgcgtgag gatgctacct ttgcaacgca ggcgggcat
 1441 aacggccagg gaagctccat tagatcttgg agctaccaca cgcgatactt tccgcaactc
 1501 aataaacagg tctacatcgc gactaacggg ggcgttcaag tattcgatgc cactgcgct
 1561 ttcaacgagc acgtgagctt tgtggttagt ggcgggtttg cttaagtcac ctcccttgc
 1621 atgggggtgat ggaacgttac ccgatgtata tagcgaatcc actccttact gtgtgacctc
 1681 catatggggc atttgcaggt agatagctgg tgtttgatca gacctgtctg gggggcgagg
 1741 gggattttct cagtggaggt cagacaatcg tttctgttgt ggtatttgt acgtatttca
 1801 ggtcttctgt cgaatacacc taacgtataa aaaaaaaaa aaaaaa

Polipeptideo de abfi

MLSNRIIAAGCIAAGSLVAAGPCDIYSSGGTGPCVAAHSTRAL
 FSAYTGPLYQVKRSGDATTAI SPLSSGVANAAQDAFCAGTTCLITIIYDQSGRGNH
 LTQAPPGGFSGPESNGYDNLASAI GAPVTLNGQKAYGVFVSPGTGYRNNAASTAKGD
 AAEEMYAVLDGTHYNGACCFDYGNARTNSRDTGNHMEAIYFGDSTVWGTGSGKGPWI
 MADLENGLFSGSSPGNNAGDPSTSYRFVTAIKGQPNQWAIIRGNGNAASGSLSTFYSGA
 RPQVSGYNPMSKEGAILLGIGDINSNGAQGTFFYEGVNTSGYPSDATENSQANIVAAR
 YAVAPLTSQPALTVGSSISLRATTACCTTRYIAHSGSTVNTQVSSSSATALKQQASW
 TVRAGLANNACFSFESRDTSGSYIRHSNFGMLVNLANDGSKLEAEDATFCTQAGINGQG
 SSIRKSWSYPTRYFRHYNTPLYIASNGGVVFDATAFNDVSVFVSGGFA

Polipeptideo de lipY

MVSYVVALPEVMSAAATDVASIGSVVATASQGVAGATTTVLA
 EDEVSAIAALFSGHGQDYQALSAQLAVFHERFVQALTGAAKGYAAELANASLLQSE
 FASGIGNGFATIHQSIQKAPTALAAGFTQVPPFAACAGIFTGTPSGAAGEDIASLW
 VKPLLSLSALETHFAIPNNPLLALIASDIPPLSWFLGNSPPPLLSLLGQTVQYTTD
 GMSVVIIPAHFTGEYVVAIHGGAFILPPSIFHMLNYSVTAYQTGATVQVPIYPLVQE
 GGTAGTVVPMAGLISTQIAQHGVSNVSVVGDASGNNLALAAQYMWVSQGNVPFSMV
 LLSPLWLDVGTWQISQAWAGNLAVNDPLVSPLYGSLNGLPPTYVYSGSLDPLAQAVVL
 EHTAVVQGAPEFVLAPWQIHDWILLTPWGLLSWPIQINQLGIAA

Polinucleotideo de lipY

1 gtggtgtctt atgttgttgc gttgcccggg gtrgtgtcgg ccgcccgcac agacgtggct
 61 tggattggtt cgggtgtcgc gacggcgagc cagggtgtcg cgggtgccc cagcaggtga
 121 ttgacgggtg ccgaggaaga ggtgtcagcc cggatccggg gtttgttttc cggccatggt
 181 caggactatc aagctcttag ccacacgctt gcyytgtttc atgagcgggt tgtcagggca
 241 ttgacagggc cggccaaggg gatatccgcc gccgagctgg ccaacgcttc gctgttgacg
 301 agtgaattcg ccagcgggtat cgggaacggt tttgccacga ttcaacagga aattcagcgg
 361 gccccacagg cgtggccgc cggattcaag caggttccgc ctttcggcgc ggcgagggca
 421 gggatcttea ccggcacgcc gtcaggggct gccggattcg acatcgcttc gctgtgccc
 481 gtgaaccccc tctgtggtt gtctgcgctc gaaactcact ttgcaatccc aaacatcca
 541 cttttagcgc tcatggccag cagatacagg ccgctgtcgt ggtttcttgg caactcccca
 601 ccgcccgttc tgaactcgtc gctgggacag acggtccagt acaccaccta tgcagggatg
 661 agcgtcgtgc agatcacgcc ggtcatcca accggcgaat acgtggttgc cattpacggc
 721 ggcgcgttta tctgcgccgc gtcaatcttc cactggctca actactcggg gacggcttac
 781 cagacggggc cagacgtgca agtgccgatt taccggttg tgcagggaag aggcactgoc
 841 gggacggtag taccggcgat ggcggggctc atctccacgc aaatcgcgca acacggggtc
 901 tccaacgtca cgtgtgtcgg ggaactccgc ggcggcaacc tgcactggc ggcggcccaa
 961 tacatggtga gccagggcaa cccagtaacg tgcctcatgg tgtgtcgtc ccgctggctc

```

1021 gatgtgggga cctggcagat cagccaggcg tgggcaggca atcttgoggt caacgacccg
1081 ctggtcagtc cgtgtatagg gtccgtgaac ggtcttcgcg cgaagtatgt ctattcgggc
1141 tcgcttgatc cgtctgcaca acaagcgggt gtccctcagc acacagccgt agtccaagga
1201 gcgccgttca gcttcgtact ggccccctgg caaatccacg actggatact gctcaccccc
1261 tgggggtttgc tgccttgccc gcagattaac cagcaactcg gtatcgccgc ctgat

```

LipJ

```

1 ttagcgogtg cgggtggcgt cgtcgogcat gagcacgcat agccggccatc tgcccggtac
61 gcccttgagt tcctgtcac caccgtcggc gaacccggtc cgtgatccgg cgaogatgtc
121 tcgcacggtc gaggacacca gcacctcaact gggtcocggcc agcgcgcaga cgcgcgcacc
181 gatattgacg gccacgcggg cgaagtccgt accgtgcgag gcacgcgcga cctcgacctc
241 gcccgcatga ataccgatcc ggacctcaat acccagcgcg gcgacccggt cgaogatgtc
301 gtccgcgcac gcgatcggcg cactcggact ggtgaacgtc gcgacgaaac cgtcacccgc
361 cgtgtttcact tcgcgacccg cgaacccgtg gatttcgtgg cacaogatgg tgcgtgggtt
421 gtccaacagg tcgcgcacc cgtcgtcggc gagcgcggcg gcgtgctggg tcgagccgac
481 gatgtcggta aacatgatgg tggcaagcat gcgtcggcg tcagcgcgcg cgcgcacgcc
541 ggtgatgaat tcctcgattt catcgagcat cggcccggtg tcgcgaaccc agtaacgggt
601 atcgggtgccc ggtagtcca ccaagcggga tccagcgatg tgcctggcga ggtagccacc
661 atgtccccc gggtatgacg tcgatccgac aoggtgcgaag atcagtgttg gagcctcgat
721 gtgtcccaag acatctcgta cgtcggcctc ggctatgacc tttgaaacgg caccggcaat
781 gctcggcggt cgggcacggc tgcggcgag atccaccag gctcgaaca cgtcatctcc
841 ggccacggta ggagccacga tgctcagcac gtcgaaagcc cgtcgacgg catcgggttc
901 cagcgccacc gtcaggaaag ggtcagctcg acgaacctgg gcgcctacc ggtagtggg
961 cgcctatagt ggcgcgcggc agccgttgac gacgatcagg ctgcgcaccc gctcggggtt
1021 gtcggcgggc agaacaagtc cgttcatggc gtggaactg ggcgcgaaa ttgtgcctg
1081 ctgcgatccg accgcgtcca tcaccgcgat cgcgtcctgg gcccgaaact tcggcccgag
1141 cgtggttatc ggcgcgagcc gtgacgacg gccgaccca ccatgggtga ggcggatcac
1201 cctgctgaat gacgcaagac ggcgatggaa acggtacagc gatggctcgt cgtcgatcga
1261 gtcgatoggc acgaaacggc ccggcaacac cagcagatcc gtcggacggc caccagcac
1321 ctggtaggcg atatccatgt cgcgcattt tgcgtagcgg gtcctgtgaa tgtggggagc
1381 ctgcgcac

```

MAQAPHIHRTRYAKCGMDIAYQVLGDGPTDLLVLPGFPEVPIDS

```

IDDEPSLYREHRRLASFSRVIRLDHRGVGLSSRLAATTTLGPKFWAQDAIAVMDAVGC
EQATIFAPSEHAMNGLVLAADYPERVRSILVNGSARPLWAPDYFVGACVRRADPFLT
VALEPDAVERGFVLSIVAPTIVAGDDVFRAMWDLAGNRAGPPSIARAVSKVIAEADV
DVLGHIEAPTLILHRVGSTYIPVGHGRYLAELIAGSRLVELPGTDTLYWVGDTPMLD
EIEEFITGVRGGADARMLATIMFTDIVGSTQHAAALGDDRWRDLNHDITVCHIEIQ
RFGGREVNTAGDGFVATFTSPSAIACADDIVDAVAALGIEVRIGIHAGEVEVRDASH
GTDVAGVAVHIGARVCALAGPSEVLVSSTVRDIVAGSRHRFAERGEQELKGVPGRWRL
CVLMRDDATRTR

```