



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

(11) PI 0620287-0 B1



(22) Data do Depósito: 15/12/2006

(45) Data de Concessão: 18/12/2018

(54) Título: MÉTODO PARA TRATAR MATERIAL CELULÓSICO COM CELOBIODROLASE, ENDOGLICANASE E BETAGLICOSIDASE, USO DO MESMO, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, USO DA MESMA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA DE FUNGO E CEPA DE ESCHERICHIA COLI, BEM COMO MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO E USO DO MESMO

(51) Int.Cl.: C12N 9/42; C12P 19/02; C12N 15/56; C12P 7/06.

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2005 FI 20051318; 22/12/2005 US 60/753,258.

(73) Titular(es): ROAL OY.

(72) Inventor(es): JARI VEHMAANPERÄ; MARIKA ALAPURANEN; MATTI SIIKA-AHO; SATU HOOMAN; SANNI VOUTILAINEN; TEEMU HALONEN; LIISA VIIKARI; TERHI PURANEN; JARNO KALLIO.

(86) Pedido PCT: PCT FI2006050558 de 15/12/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/071818 de 28/06/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/06/2008

(57) Resumo: MÉTODO PARA TRATAR MATERIAL CELULÓSICO, USO DO MESMO, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, USO DA MESMA, POLIPEPTÍDEO, USO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO MESMO. A presente invenção refere-se à produção de hidrolases de açúcar a partir de material celulósico. O método pode ser usado, por exemplo, para produzir açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico. São descritas as enzimas lignocelulósicas e sua produção por tecnologia recombinante, bem como os usos das enzimas e preparações de enzima.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA TRATAR MATERIAL CELULÓSICO COM CELOBIOIDROLASE, ENDOGLICANASE E BETA-GLICOSIDASE, USO DO MESMO, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, USO DA MESMA, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA DE FUNGO E CEPA DE ESCHERICHIA COLI, BEM COMO MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO E USO DO MESMO"**.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à produção de hidrolisados de açúcar de material celulósico. Mais precisamente a invenção se refere à produção de açúcares fermentados de material lignocelulósico por conversão enzimática. Os açúcares fermentados são úteis, por exemplo, na produção de bioetanol ou para outros fins. Especificamente a presente invenção se refere a um método para tratar material celulósico com celobioidrolase, endoglicanase, beta-glicosidase, e opcionalmente xilanase, e às preparações de enzimas e aos empregos das mesmas. A invenção se refere, adicionalmente, aos novos polipeptídeos celulósicos, polinucleotídeos codificando os mesmos e aos vetores e células hospedeiras contendo os polinucleotídeos. Ainda, adicionalmente, a invenção se refere aos usos dos polipeptídeos e a um método de preparação dos mesmos.

Histórico da Invenção

Os hidrolisados de açúcar podem ser usados para produção microbiana de uma variedade de substâncias químicas finas ou biopolímeros, tais como, ácidos orgânicos, por exemplo, ácido láctico ou etanol ou outros álcoois, por exemplo, n-butanol, 1,3-propanodiol ou poliidroxicanoatos (PHAs). Os hidrolisados de açúcar podem também servir como matéria prima para outros processos não microbianos, por exemplo, para enriquecimento, isolamento e purificação de açúcares de valor alto ou vários processos de polimerização. Um dos maiores empregos dos hidrolisados de açúcar é na produção dos biocombustíveis. A produção de bioetanol e/ou outras substâncias químicas pode acontecer em um processo integrado em uma refinaria (Wyman 2001).

As fontes limitadas de combustíveis fósseis e as crescentes

1a

quantidades de CO₂ liberadas dos mesmos e que causam o fenômeno de estufa vêm elevando a necessidade do emprego de biomassa como uma

Segue-se folha 2

fonte de energia limpa e renovável. Uma tecnologia alternativa e promissora é a produção de biocombustíveis, isto é, etanol, de materiais celulósicos. No setor de transporte, os biocombustíveis estão sendo a única opção, que poderia reduzir as emissões de CO₂ em uma ordem de grandeza. O etanol pode ser empregado nos veículos e sistemas de distribuição existentes e assim não requer investimentos de infra-estrutura caros. Os açúcares derivados de matérias-primas lignocelulósicas renováveis podem também ser usados como matérias-primas para uma variedade de produtos químicos que podem substituir as substâncias químicas à base de petróleo.

10 A maior parte dos carboidratos em plantas está na forma de lignocelulose o que consiste essencialmente em celulose, hemicelulose, pectina e lignina. Em um processo de lignocelulose-em-etanol, o material lignocelulósico é primeiro pré-tratado tanto química quanto fisicamente, de modo a tornar a fração celulósica mais acessível à hidrólise. A fração celulósica é então hidrolisada para obter açúcares que podem ser fermentados por levedura em etanol. A lignina é obtida como co-produto principal que pode ser usado como um combustível sólido.

Os custos de produção do bioetanol são altos e o rendimento de energia é baixo e existem pesquisas constantes para tornar o processo mais econômico. A hidrólise enzimática é considerada a tecnologia mais promissora para conversão da biomassa celulósica em açúcares fermentáveis. Contudo, a hidrólise enzimática é empregada apenas a uma quantidade limitada em escala industrial e especialmente quando se emprega material fortemente lignificado, tal como madeira ou resíduo agrícola, a tecnologia não é satisfatória. O custo da etapa enzimática é um de fatores econômicos principais do processo. Foram feitos esforços para aperfeiçoar a eficácia da hidrólise enzimática do material celulósico (Badger 2002).

A patente US 2002/019 2774 A1 descreve um processo contínuo para conversão da biomassa lignocelulósica em produtos combustíveis. Após pré-tratamento por oxidação a úmido ou explosão de vapor, a biomassa é parcialmente separada em celulose, hemicelulose e lignina, e é então submetida a hidrólise parcial usando uma ou mais enzimas de carboidrase

(EC 3.2). Celluclast[®], um produto comercial da Novo Nordisk A/S contendo atividades de celulase e xilanase é fornecido como um exemplo.

A patente US 2004/000 5674 A1 descreve novas misturas de enzima que podem ser empregadas diretamente no substrato de lignocelulose, pelo que, os produtos residuais tóxicos formados durante os processos de pré-tratamento podem ser evitados, e a energia pode ser poupada. A mistura de enzima sinérgica contém uma celulase e uma enzima auxiliar, tal como, celulase, xilanase, ligninase, amilase, protease, lipídase ou glicuronidase ou qualquer combinação das mesmas. A celulase é considerada como incluído endoglicanase (EG), beta-glicosidase (BG) e celobioidrolase (CBH). Os exemplos ilustram o uso de uma mistura de *Trichoderma* xilanase e preparações de celulase.

Kurabi e outros (2005) investigaram hidrólise enzimática de explosão de vapor e organossolve etanol-pré-tratado Douglas-fir por novas celulasas de fungo comerciais. Eles testaram duas preparações de *Trichoderma reesei* celulase comerciais e duas preparações novas produzidas por cepas mutantes de *Trichoderma sp.* e *Penicillium sp.* A preparação de *Trichoderma sp.* mostrou desempenho significativamente melhor que o das outras preparações. Acredita-se que o melhor desempenho foi pelo menos devido em parte a uma atividade de beta-glicosidase significativamente maior, o que alivia a inibição da produção de celobioidrolase e endoglicanase.

A Patente US 2004/005 3373 A1 refere-se a um método para conversão de celulose em glicose por tratamento de um substrato lignocelulósico tratado com uma mistura enzimática compreendendo celulase e uma celobioidrolase I modificada (CBHI). A CBHI foi modificada por inativação de seu domínio de ligação de celulose (CBD). Vantagens da modificação de CBHI são, por exemplo, melhor recuperação e taxa de hidrolase maior com alta concentração de substrato. A celulase é selecionada do grupo consistindo em EG, CBH e BG. A CBHI é obtida preferivelmente do *Trichoderma*.

A Patente US 2005/016 4355 A1 descreve um método para degradar o material lignocelulósico com uma ou mais enzimas celulósicas na presença de pelo menos um agente tensoativo. Enzimas adicionais, tais co-

mo, hemicelulases, esterase, peroxidase, protease, lacase ou mistura das mesmas podem também ser usadas. A presença de agente tensoativo aumenta a degradação do material lignocelulósico em comparação à ausência do agente tensoativo. As enzimas celulósicas podem ser qualquer enzima envolvida na degradação da lignocelulose incluindo CBH, EG e BG.

Existem inúmeras publicações revelando várias celulasas e hemicelulasas.

Celobioidrolases (CBHs) são reveladas, por exemplo, no WO 03/000 941, que refere-se às enzimas CBHI obtidas de vários fungos. Não é provida qualquer propriedade fisiológica das enzimas, nem quaisquer exemplos de seus empregos. Hong e outros (2003b) caracterizam CBHI de *Thermoascus aurantiacus* produzidos por levedura. As aplicações da enzima não são descritas. Tuohy e outros (2002) descreve três formas de celobiohidrolases de *Talaromyces emersonii*.

Endoglicanases da família cel5 (EGs fam 5) são descritas, por exemplo, no WO 03/062 409, que refere-se às composições compreendendo pelo menos duas enzimas termoestáveis para uso em aplicações de alimentação. Hong e outros (2003a) descrevem a produção de endo- β -1,4-glicanase termoestáveis de *T. aurantiacus* em levedura. Nenhuma aplicação é explicada. O WO 01/70998 refere-se às β -glicanases de *Talaromyces*. Elas também descrevem β -glicanases de *Talaromyces emersonii*. Aplicações em alimentos, suplementos, bebidas, cervejaria e detergentes são discutidas. A lignose da lignocelulose não é mencionada. O WO 08/06 858 descreve beta-1,4-endoglicanase de *Aspergillus niger* e revela aplicações da enzima em alimentos e suplementos. O WO 97/12853 revela métodos para classificação de fragmentos de DNA codificando enzimas em bibliotecas de DNAc. A biblioteca de DNAc tem origem em levedura ou fungos, preferivelmente *Aspergillus*. A enzima é preferivelmente uma celulase. Van Petegem e outros (2002) descrevem a estrutura tridimensional de uma endoglicanase da família cel5 de *Thermoascus aurantiacus*. Parry e outros (2002) descrevem o modelo de ação de uma endoglicanase da família cel5 de *Thermoascus aurantiacus*.

As endoglucanases da família cel7 (EGs fam 7) são reveladas, por exemplo, no US 5.912.157, que refere-se à endoglicanase de *Myceliphthora* e seus homólogos e aplicações da mesma em detergente, têxteis e polpas. A Patente US 6.071.735 revela celulases exibindo alta atividade de endoglicanase em condições alcalinas. Os usos como detergente, na polpa e papel e aplicações têxteis são revelados. O bioetanol não é mencionado. A Patente US 5.763.254 revela enzimas de degradação de celulose/hemicelulose e possuindo resíduos de aminoácido conservados em CBD.

Endoglucanases da família cel45 (EGs fam 45) são descritas, por exemplo, na Patente US 6.001.639, que refere-se às enzimas possuindo atividade endoglicanase e possuindo duas seqüências de aminoácido conservadas. O uso em têxteis, detergentes e aplicações em polpa e papel são geralmente revelados e o tratamento de material lignocelulósico é mencionado, porém não são fornecidos exemplos. O WO 2004/053039 refere-se às aplicações detergentes das endoglucanases. A Patente US 5.958.082 descreve o uso de endoglicanase, especialmente de *Thielavia terrestris* em aplicações têxteis. A Patente EP 0495258 refere-se às composições detergentes contendo Humicola celulase. A Patente US 5.948.672 descreve a preparação de celulase contendo endoglicanase, especialmente de Humicola e seu emprego em aplicações têxteis e polpa. A hidrólise da lignocelulose não é mencionada.

Uma pequena quantidade de beta-glicosidade (BG) melhora a hidrólise da biomassa para glicose por hidrólise da celobiose produzida por celobioidrolases. A conversão da celobiose em glicose é geralmente a etapa de limitação de taxa maior. As beta-glicosidades são reveladas, por exemplo, na Patente US 2005/021 4920, que refere-se ao BG de *Aspergillus fumigatus*. A enzima foi produzida em *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei*. O uso da enzima na degradação da biomassa ou aplicações detergentes é discutido de modo geral, porém não exemplificado. O WO 02/095 014 descreve uma enzima de *Aspergillus oryzae* possuindo atividade de celobiase. O uso na produção de etanol a partir da biomassa é discutido de modo geral, porém não exemplificado. O WO 2005/074656 revela polipeptídeos possuindo

do atividade de melhora celulósica derivada, por exemplo, de *T. aurantiacus*; *A. fumigatus*; *T. terrestris* e *T. aurantiacus*. O WO 02/26979 revela processamento enzimático de material de planta. A Patente US 6.022.725 descreve a clonagem e ampliação do gene de beta-glicosidade do *Trichoderma reesei* e a Patente US 6.103.464 descreve um método para detectar o DNA codificando uma beta-glicosidade de um fungo filamentoso. Nenhum exemplo de aplicação é fornecido.

As xilanases são descritas, por exemplo, no FR2786784, que refere-se a uma xilanase estável em calor, útil por exemplo, no tratamento de suprimentos para animais e na fabricação de pães. A enzima é derivada de um fungo termofílico, especificamente do gênero *Thermoascus*.

A Patente US 6.197.564 descreve enzimas possuindo atividade xilanase e obtidas de *Aspergillus aculeatus*. Sua aplicação na fabricação de pães é exemplificada. O WO 02/24926 refere-se às xilanases de *Talaromyces*. São fornecidos exemplos de alimentos e de fabricação de pães. O WO 01/42433 revelam xilanase termoestável de *Talaromyces emersonii* para uso em aplicações de alimentos e suprimentos.

As enzimas celulósicas melhor investigadas e aplicadas mais amplamente de origem de fungos foram derivadas de *Trichoderma reesei* (a anamorfa da *Hypocrea jecorina*). Conseqüentemente também, a maioria das celulasas de fungos disponíveis comercialmente é derivada de *Trichoderma reesei*. Contudo, a maioria das celulasas de fungos menos conhecidas não foi aplicada nos processos de importância prática, tais como, na degradação do material celulósico, incluindo lignocelulose.

Existe uma necessidade contínua de novos métodos de degradação de substratos celulósicos, especificamente substratos lignocelulósicos, e para novas enzimas e misturas de enzimas que melhoraram a eficácia da degradação. Existe também a necessidade de processos e enzimas que trabalhem em temperaturas altas, assim permitindo o emprego de maior consistência da biomassa e conduzindo a concentrações maiores de açúcar e etanol. Essa abordagem podem conduzir a economia significativa nos custos de energia e investimentos. A temperatura alta também diminui o risco de

contaminação durante a hidrólise. A presente invenção tem como objetivo satisfazer pelo menos partes dessas necessidades.

Breve Descrição da Invenção

Foi verificado surpreendentemente que as enzimas celulósicas e especialmente as celobioidrolases obtidas de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum* são especificamente úteis na hidrólise de material celulósico. Além das celobioidrolases, esses fungos possuem endoglicanases, beta-glicosídeos e xilanases que são muito apropriadas para degradação de material celulósico. As enzimas são cineticamente muito eficazes sobre uma ampla faixa de temperaturas e embora elas tenham atividade muito alta em temperaturas altas, elas também são muito eficientes em temperaturas de hidrólise padrão. Isso as torna extremamente bem apropriadas aos vários processos de hidrólise de substrato celulósico realizados em temperaturas convencionais e temperaturas elevadas.

A presente invenção provê um método para tratamento de material celulósico com celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosídeo, pelo que a celobioidrolase compreende uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com relação às SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 ou 8 ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

A invenção provê adicionalmente, uma preparação de enzima compreendendo celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosídeo, onde a celobioidrolase compreende uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação às SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 ou 8 ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

O uso da preparação de enzima para degradar material celulósico também é provido, bem como o uso do material em um processo para preparação de etanol a partir de material celulósico.

A invenção também refere-se a um polipeptídeo compreendendo um fragmento possuindo atividade celulósica e sendo selecionado do grupo consistindo em:

a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoá-

5 cido possuindo pelo menos 66% de identidade com relação à SEQ ID Nº:4, 79% de identidade com relação à SEQ ID Nº:6, 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 12, 68% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 14, 72% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 16, 68% de identidade com relação à SEQ ID Nº:20, 74% de identidade com relação à SEQ ID Nº:22 ou 24, ou 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº:26;

b) uma variante de a) compreendendo um fragmento possuindo atividade celulósica; e

c) um fragmento de a) ou b) possuindo atividade celulósica.

10 Um objetivo adicional da invenção é um polinucleotídeo isolado selecionado do grupo consistindo em:

a) uma seqüência de nucleotídeo das SEQ ID Nº: 3, 5, 11, 13, 15, 19, 21, 23 ou 25, ou uma seqüência codificando um polipeptídeo da reivindicação 35;

15 b) um filamento complementar de a)

c) um fragmento de a) ou b) compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos; e

d) uma seqüência que se degenera como resultado do código genético em qualquer uma das seqüências conforme definido em a), b) ou c).

20 A invenção ainda provê, adicionalmente, um vetor, que compreende o polinucleotídeo como uma seqüência heteróloga, e uma célula hospedeira compreendendo o dito vetor. Cepas de *Escherichia coli* possuindo número de acesso DSM 16728, DSM 16729, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667 estão também
25 incluídas na invenção.

Outros objetivos da invenção são preparações enzimáticas compreendendo pelo menos um dos novos polipeptídeos e o uso do dito polipeptídeo ou preparação de enzima no combustível, têxtil, detergente, polpa e papel, alimentos, suprímentos ou indústria de bebidas.

30 Também é provido um método adicional para preparação de um polipeptídeo compreendendo um fragmento possuindo atividade celulósica e sendo selecionado do grupo consistindo em:

a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 66% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 4, 79% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 6, 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 12, 68% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 14, 72% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 16, 68% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 20, 74% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 22 ou 24, ou 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 26;

b) uma variante de a) compreendendo um fragmento possuindo atividade celulósica; e

10 c) um fragmento de a) ou b) possuindo atividade celulósica, o dito método compreendendo transformação de uma célula hospedeira com um vetor codificando o dito polipeptídeo, e cultivo da célula hospedeira sob condições que permitem expressão do dito polipeptídeo, e opcionalmente recuperação e purificação do polipeptídeo produzido.

15 Também ainda é provido um método para tratamento de material celulósico com um meio de cultivo gasto de pelo menos um microorganismo capaz de produzir um polipeptídeo conforme definido acima, onde o método compreende reação do material celulósico com o meio de cultura gasto para obter o material celulósico hidrolisado.

20 Concretizações específicas da invenção são estabelecidas nas reivindicações dependentes.

Outros objetivos, detalhes e vantagens da presente invenção ficarão claros dos desenhos que se seguem, descrição detalhada e exemplos.

Breve Descrição dos Desenhos

25 Figura 1. Dependências de temperatura das atividades de celulase e beta-glicosidase nos sobrenadantes das seis cepas de fungos testadas. O tempo de incubação no ensaio foi de 60 minutos na temperatura dada, o pH do ensaio era de 5,0 (atividade de MUL) ou 4,8 (CMCase ou BGU). A atividade obtida a 60°C é estabelecida como a atividade relativa de 100%.

30 A) *Thermoascus aurantiacus* ALKO4239, B) *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, C) *Acremonium thermophilum* ALKO4245, D) *Talaromyces thermophilus* ALKO4246, E) *Chaetomium thermophilum* ALKO4261, F) *Chaetomium*

thermophilum ALKO4265.

Figura 2. Ilustração esquemática dos cassetes de expressão usados na transformação dos protoplastos de *Trichoderma reesei* para produção de proteínas de fungos recombinantes. Os genes recombinantes estavam sob controle do promotor (*cbh1 prom*) de *T. reesei* (*cel7A*) e a terminação da transcrição foi garantida por emprego da sequência terminadora *T. reesei cbh1* (termo *cbh1*). O gene *amdS* foi incluído como um marcador de transformação.

Figura 3. A) pH ótimo das preparações de proteína CBH/Cel7 recombinantes do *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 determinado em 4-metilumbeliferil- β -D-lactosídeo (MUL) a 50°C, 10 minutos. Os resultados são fornecidos como média ($\pm$ SD) de três medições separadas. B) Estabilidade térmica das preparações de proteína CBH/Cel7 recombinantes a partir de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 determinada no 5-metilumbeliferil- β -D-lactosídeo (MUL) em pH ótimo por 60 minutos. Os resultados são fornecidos como média ($\pm$ SD) de três medições separadas. Ambas reações continha BSA (100 μ g/mL) como um estabilizador.

Figura 4. Hidrólise de celulose cristalina (Avicel) por celobioidrolases recombinantes purificadas a 45°C. Concentração do substrato 1% (peso/volume), pH 5,0, concentração de enzima 1,4 μ M. A) Celobioidrolases abrigando um CBD, B) celobioidrolases (núcleo) sem um CBD.

Figura 5. Hidrólise de celulose cristalina (Avicel) por celobioidrolases recombinantes purificadas a 70°C. A concentração de substrato 1% (peso/volume), pH 5,0, concentração da enzima 1,4 μ M. A) celobioidrolases abrigando um CBD, B) celobioidrolases (núcleo) sem um CBD.

Figura 6.A) A dependência do pH da atividade de EG-40/Cel45A de *Acremonium*, semelhante a EG-40/Cel45B e de EG-28/Cel5A de *Thermoascus* produzidos heterologicamente foi determinada com substrato CMC em uma reação de 10 minutos a 50°C. B) A temperatura ótima de EG-40/Cel45A de *Acremonium*, semelhante a EG-40/Cel45B e de EG-28/Cel5A

de *Thermoascus*, foi determinada em pH 5,5, 4,8 e 6,0, respectivamente. A reação contendo CMC como substrato foi realizada por 60 minutos, exceto para EG-28/Cel5A por 10 min. BSA (100 µg/mL) foi adicionado como um estabilizador.

5 Figura 7.A) A dependência do pH da atividade de BG-101/Cel3A de *Acremonium*, BG-76/Cel3A de *Chaetomium* produzidos heterologamente e de BG-81/Cel3A de *Thermoascus* produzidos heterologamente foi determinada com substrato de 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo em uma reação de 10 minutos a 50°C. B) A temperatura ótima de βG-101/Cel3A de *Acremonium*, βG-76/Cel3A *Chaetomium*, e βG-81/Cel3A de *Thermoascus* foi determinada em pH de 4,5, 5,5 e 4,5, respectivamente. A reação contendo 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo como substrato foi realizada por 60 min, BSA (100 µg/mL) foi adicionado como um estabilizador.

15 Figura 8.A) A dependência de pH da atividade da xilanase de XYN-30/*Xyn10A* de *Thermoascus* produzido heterologamente foi determinada com substrato de xilana de bétula em uma reação de 10 minutos a 50°C. B) A temperatura ótima de XYN-30/*Xyn10A* foi determinada em pH 5,3 em uma reação de 60 minutos, BSA (100 µg/mL) foi adicionado como um estabilizador.

20 Figura 9. Hidrólise de fibra de spruce explodida em vapor (10 mg/mL) com uma mistura de enzimas termofílicas (MISTURA 1) e enzimas de *T. reesei* a 55 e 60°C. A dosagem da enzima é fornecida por FPU/ga de matéria seca do substrato, FPU ensaiada a 50°C, pH 5. A hidrólise foi realizada por 72 horas em pH 5, com mistura. Os resultados são fornecidos como uma média (±SD) de três medições separadas.

25 Figura 10. Hidrólise de palha de milho explodido em vapor (10 mg/mL) com uma mistura de enzimas termofílicas (MISTURA 2) e enzimas de *T. reesei* a 45, 55 e 57,5°C. A dosagem da mistura foi para "MISTURA 2" de 5 FPU/g de matéria seca do substrato e para enzimas de *T. reesei* de 5 FPU/g de matéria seca Celluclast suplementada com 100 nkat/g de matéria seca Novozym 188 (a atividade do papel filtro foi ensaiada a 50°C, pH 5). A hidrólise foi realizada por 72 horas em pH 5, com mistura. Os resultados são

fornecidos como a média ($\pm$ SD) de três medições separadas. O substrato continha açúcares de redução solúveis (cerca de 0,7 mg/mL). Esse teor do açúcar de base foi subtraído dos açúcares de redução formados durante a hidrólise.

5 Figura 11. Hidrólise de palha de milho explodido em vapor (10 mg/mL) com uma mistura de enzimas termofílicas contendo uma nova xilânase termofílica de *Thermoascus aurantiacus* (MISTURA 3) e enzimas de *T. reesei* a 45, 55 e 60°C. A dosagem da enzima foi para "MISTURA 3" de 5 FPU/g de matéria seca do substrato e para enzimas de *T. reesei* de 5 FPU/g
10 de matéria seca Celluclast suplementada com 100 nkat/g de matéria seca Novozym 188 (a atividade do papel filtro foi ensaiada a 50°C, pH 5). A hidrólise foi realizada por 72 horas em pH 5, com mistura. Os resultados são fornecidos como a média ($\pm$ SD) de três medições separadas. O substrato continha açúcares de redução solúveis (cerca de 0,7 mg/mL). Esse teor do açúcar
15 de base foi subtraído dos açúcares de redução formados durante a hidrólise.

 Figura 12. Hidrólise de fibra de espruce explodida em vapor (10 mg/mL) com uma mistura de enzimas termofílicas contendo uma nova xilânase termofílica XYN-30/Xyn10A de *Thermoascus aurantiacus* (MISTURA 3) e enzimas de *T. reesei* a 45, 55 e 60°C. A dosagem da enzima para a "MISTURA 3" foi de 5 FPU/g de matéria seca de substrato e para as enzimas de *T. reesei* de 5 FPU/g de matéria seca Celluclast suplementada com 100 nkat/g de matéria seca Novozym 188 (a atividade do papel filtro foi ensaiada a 50°C, pH 5). A hidrólise foi realizada por 72 horas em pH 5, com mistura.
20 Os resultados são fornecidos como a média ($\pm$ SD) de três medições separadas.
25

 Figura 13. O efeito da glicose na atividade das diferentes preparações de β -glicosidase. O ensaio padrão usando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como substrato foi realizado na presença de glicose na mistura de ensaio. A atividade é apresentada como porcentagem da atividade obtida sem glicose.
30

 Figura 14. Atividades de FPU das misturas de enzima em tem-

peraturas de 50°C a 70°C, apresentadas como uma porcentagem da atividade sob condições padrão (50°C, 1 hora).

Figura 15. A atividade de celulase relativa de duas cepas diferentes de *T. reesei* crescidas em meio contendo Nutriose não tratada (N0) ou Nutriose pré-tratada com BG-81/Cel3A (NBG81) como uma fonte de carbono.

Descrição Detalhada da Invenção

A celulose é o maior componente estrutural das plantas superiores. Ela provê as células da planta com resistência à tensão ajudando as mesmas a resistirem ao estresse mecânico e pressão osmótica. A celulase é um composto β -1,4-glicano de cadeias lineares de resíduos de glicose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas. A celobiose é a menor unidade de repetição da celulose. Nas paredes das células, a celulose é embalada em folhas orientadas de vários modos, que são envolvidas em uma matriz de hemicelulose e lignina. A hemicelulose é um grupo heterogêneo de polímeros de carboidrato contendo principalmente glicanos, xilanos e mananos diferentes. A hemicelulose consiste em uma estrutura linear com resíduos ligados em β -1,4 substituídos por cadeias laterais curtas geralmente contendo acetila, glucuronila, arabinosila e galactosila. A hemicelulose pode ser ligada quimicamente à lignina. A lignina é um polímero reticulado e complexo de unidades de p-hidroxifenilpropano substituído de várias formas que provê resistência à parede da célula de modo a suportar o estresse mecânico e também proteger a celulose da hidrólise enzimática.

A lignocelulose é uma combinação de celulose e hemicelulose e polímeros de unidades de propanol e lignina. Ela é fisicamente dura, densa e inacessível e o material bioquímico mais abundante na biosfera. Os materiais contendo lignocelulose são por exemplo: lascas de madeira dura e madeira macia, polpa de madeira, serragem e lixo florestal e industrial de madeira; biomassa agrícola como palhas de cereais, polpa de beterraba, palha de milho e cobs, bagaço da cana de açúcar, caules, folhas, cálices, cascas e semelhantes; produtos residuais, tais como, lixo sólido municipal, jornais e lixo produzido por escritórios, resíduo industrial e por exemplo de grãos; colheitas de energia dedicada (por exemplo, salgueiro, choupo, gramínea do

tipo switchgrass nativa da América do Norte, alpeste, e semelhantes). Exemplos preferidos são palha de milho, gramínea do tipo "switchgrass" nativa da América do Norte, palha de cereais, bagaço da cana-de-açúcar e materiais derivados de madeira.

5 "Material celulósico" conforme usado aqui, refere-se a qualquer material compreendendo celulose, hemicelulose e/ou lignocelulose como um componente significativo. "Material lignocelulósico" significa qualquer material compreendendo lignocelulose. Tais materiais são, por exemplo, materiais de planta tais como, madeira incluindo madeira dura e madeira macia, plantas herbáceas, resíduos agrícolas, resíduos de polpa e madeira, papel residual, resíduos da indústria alimentícia e de suprimentos, etc. As fibras têxteis, tais como, algodão, fibras derivadas de algodão, linho, cânhamo, juta e as fibras celulósicas fabricadas pelo homem como, modal, viscose, liocel são exemplos específicos de materiais celulósicos.

15 O material celulósico é degradado na natureza por vários organismos incluindo bactérias e fungos. A celulose é tipicamente degradada por diferentes celulasas agindo seqüencial ou simultaneamente. A conversão biológica em glicose geralmente requer três tipos de enzimas hidrolíticas: (1) Endoglicanases que cortam as ligações internas beta-1,4-glicosídicas; (2) Exocelobioidrolases que cortam a celobiose de dissacarídeo da extremidade da cadeia de polímero de celulose; (3) Beta-1,4-glicosidases que hidrolisam a celobiose e outros celo-oligossacarídeos curtos em glicose. Em outras palavras, os três maiores grupos de celulasas são celobioidrolases (CBH), endoglicanases (EG) e beta-glicosidases (BG).

25 A degradação dos substratos contendo celulose mais complexos requer uma ampla faixa de várias enzimas. Por exemplo, a lignocelulose é degradada por hemicelulasas, como xilanases e mananases. A hemicelulase é uma enzima que hidrolisa a hemicelulose.

30 "Enzimas celulósicas" são enzimas possuindo "atividade celulósica" que significa que elas são capazes de hidrolisar substratos celulósicos ou derivados dos mesmos em sacarídeos menores. As enzimas celulósicas assim incluem ambas celulasas e hemicelulasas. As celulasas conforme

empregado aqui incluem celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosidase.

T. reesei possui um sistema de celulase eficaz e bem conhecido contendo dois CBH's, dois principais e vários EG's e BG's menores. CBHI de *T. reesei* (Cel7A) corta o açúcar da extremidade de redução da cadeia de
5 celulose, possui um domínio de ligação de celulose C-terminal (CBD) e pode construir até 60% da proteína secretada total. CBHII de *T. reesei* (Cel6A) corta o açúcar da extremidade de não redução da cadeia de celulose, possui um domínio de ligação de celulose N-terminal e pode constituir até 20% da proteína secretada total. Endoglicanases EGI (Cel7B) e EGV (Cel45A) pos-
10 suem um CBD em seu C-terminal, EGII (Cel5A) possui um N-terminal CBD e EGIII (Cel12A) não possui um domínio de ligação de celulose. CBHI, CBHII, EGI e EGII são denominados "celulases principais" de *Trichoderma* compreendendo em conjunto 8-90% das proteínas secretadas totais. Um versado na técnica tem conhecimento de que uma enzima pode ser ativa em vários
15 substratos e as atividades enzimáticas podem ser medidas usando diferentes substratos, métodos e condições. A identificação das diferentes atividades celulósicas é revelada, por exemplo, em van Tilberugh e outros, 1988.

Além de um domínio/núcleo catalítico expressando atividade celulósica, as enzimas celulósicas podem compreender um ou mais domínios
20 de ligação de celulose (CBDs), também denominados domínios/módulos de ligação de carboidrato (CBD/CBM), que pode estar localizado tanto no N-quanto C-terminal do domínio catalítico. CBDs possuem atividade de ligação de carboidrato e eles mediam a ligação da celulase à celulose cristalina, porém possuem pouco ou nenhum efeito sobre a atividade hidrolítica de celu-
25 lase da enzima nos substratos solúveis. Esses dois domínios são tipicamente conectados através de uma região ligante altamente glicosilada e flexível.

"Celobioidrolase" ou "CBH" conforme usado aqui, refere-se às enzimas que clivam celulose a partir da extremidade da cadeia de glicose e produzem principalmente celobiose. Elas também são denominadas 1,4-
30 beta-D-glicano celobioidrolases ou 1,4-beta-celobiosidases de celulose. Elas hidrolisam as ligações 1,4-beta-D-glicosídicas das extremidades de redução ou não redução de um polímero contendo as ligações, tais como, celulose,

pelo que a celobiose é liberada. Duas BCHs diferentes foram isoladas do *Trichoderma reesei*, CBHI e CBHII. Elas possuem uma estrutura molecular consistindo em um domínio catalítico ligado a um domínio de ligação de celulose (CBD). Existem também celobioidrolases na natureza que não possuem CBD.

5 "Endoglicanase" ou "EG" refere-se às enzimas que cortam as ligações glicosídicas internas da cadeia de celulose. Elas são classificadas como EC 3.2.1.4. Elas são 1,4-beta-D-glican 4-glicanoidrolases e catalisam a endoidrólise das ligações 1,4-beta-D-glicosídicas nos polímeros de glicose, tais como, celulose e derivados dos mesmos. Algumas endoglicanases ocorrendo naturalmente possuem um domínio de ligação de celulose, enquanto outras não. Algumas endoglicanases possuem também atividade de xilase (Bailey e outros, 1993).

15 "Beta-glicosidase" ou "BG" ou " β G" refere-se às enzimas que degradam pequenos oligossacarídeos solúveis incluindo celobiose em glicose. Elas são classificadas como EC 3.2.1.21. Elas são beta-D-glicosídeo glicoidrolases que catalisam tipicamente a hidrólise de resíduos de beta-D-glicose de não redução terminal. Essas enzimas reconhecem oligossacarídeos de glicose. Substratos típicos são celobiose e celotriose. A celobiose é um inibidor das celobioidrolases, pelo que, a degradação da celobiose é importante para superar a inibição do produto final das celobioidrolases.

20 As xilanases são enzimas que são capazes de reconhecer e hidrolisar a hemicelulose. Elas incluem ambas enzimas exoidrolíticas e endoidrolíticas. Tipicamente, elas possuem atividade endo-1,4-beta-xilanase (EC 3.2.1.8) ou beta-D-xilosidase (EC 3.2.1.37) que rompe a hemicelulose em xilose. "Xilanase" ou "Xin" em conexão com a presente invenção refere-se especialmente a uma enzima classificada como EC 3.2.1.8 hidrolisando polímeros de xilose do substrato lignocelulósico ou xilana purificada.

25 Além disso, as celulases podem ser classificadas em várias famílias de glicosil hidrolase de acordo com sua sequência primária, sustentada por análise da estrutura tridimensional de alguns elementos da família (Henrissat 1991, Henrissat e Bairoch 1993, 1996). Algumas glicosil hidrolases são enzimas multifuncionais que contêm domínios catalíticos que per-

tencem à diferentes famílias de glicosil hidrolase. A família 3 consiste em beta-glicosidasas (EC 3.2.1.21) tais como Ta BG-81, At BG-101 e ct BG-76 descritas aqui. A família 5 (anteriormente conhecida como celA) consiste principalmente em endoglicanases (EC 3.2.1.4) tais como Ta EG-28 descrita aqui. A família 7 (anteriormente família celulase celC) contém endoglicanases (EC 3.2.1.4) e celobioidrolases (EC 3.2.1.91) tais como, Ct EG-54, Ta CBH, At CBH-A, At CBH-C e ct CBH descritas aqui. A família 10 (anteriormente celF) consiste principalmente nas xilanases (EC 3.2.1.8) tais como Ta XYN-30 e At XYN-60 descritas aqui. A família 45 (anteriormente celK) contém endoglicanases (EC 3.2.1.4) tais como At EG-40 e At semelhante a EG-40 descritas aqui.

As enzimas celulósicas úteis para hidrólise do material celulósico são obtidas de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*. "Obtidas de" significa que elas podem ser obtidas das ditas espécies, porém isso não exclui a possibilidade de que elas sejam obtidas de outras fontes. Em outras palavras, elas podem se originar de qualquer organismo incluindo plantas. Preferivelmente, elas se originam de microorganismos, por exemplo, bactérias ou fungos. A bactéria pode ser, por exemplo, de um gênero selecionado dentre *Bacillus*, *Azospirillum* e *Streptomyces*. Mais preferivelmente a enzima se origina de fungos (incluindo fungos filamentosos e leveduras), por exemplo de um gênero selecionado do grupo consistindo em *Thermoascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Achaetomium*, *Thielavia*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Chrysosporium*, *Collybia*, *Fomes*, *Fusarium*, *Humicola*, *Hypocrea*, *Lentinus*, *Melanocarpus*, *Myceliophthora*, *Myriococcum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Polyporus*, *Rhizoctonia*, *Scytalidium*, *Pycnoporus*, *Trametes* e *Trichoderma*.

De acordo com uma concretização preferida da invenção as enzimas podem ser obtidas da cepa *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 depositada como CBS 116239, cepa ALKO4245 depositada como CBS 116240 presentemente classificada como *Acremonium thermophilum*, ou cepa *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 depositada como CBS 730.95.

A celobioidrolase compreende, preferivelmente, uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação às SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 ou 8 ou um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

Celobioidrolase	Gene	obtida de	CB D	Ácido nucléico, SEQ ID N ^o :	Aminoácido, SEQ ID N ^o :
Ta CBH	Ta cel7A	<i>T. aurantiacus</i>	-	1	2
At CBH_A	At cel/7B	<i>A. thermophilum</i>	-	3	4
At CBH_C	At cel/7A	<i>A. thermophilum</i>	+	5	6
Ct CBH	Ct cel7A	<i>C. thermophilum</i>	+	7	8

- Essas CBHs possuem uma constante de inibição de celulose vantajosa em comparação aquela da CBH de *Trichoderma reesei* e elas mostram resultados de hidrólise aperfeiçoados quando se testa vários substratos celulósicos. As SEQ ID N^{os}: 2 e 4 não compreendem uma CBH. Os resultados de hidrólise especificamente melhorados podem ser obtidos quando um domínio de ligação de celulose (CBH) é anexado a uma CBH que não possui CBD propriamente. O CBD pode ser obtido de um *Trichoderma* ou espécies *Chaetomium*, e é preferivelmente anexado à CBH através de um ligante. A proteína de fusão resultante contendo uma região de núcleo de CBH anexada a um CBD através de um ligante pode compreender uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação às SEQ ID N^{os}: 28 ou 30. Os polinucleotídeos compreendendo uma sequência da SEQ ID N^o: 27 ou 29 codificam tais proteínas de fusão.

- A endoglicanase pode compreender uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID N^o: 10, 12, 14 ou 16 ou um fragmento enzimaticamente ativo da mesma. Essas endoglicanases possuem boa estabilidade térmica.

Endoglicanase	Gene	Obtida de	CB D	Ácido nucléico, SEQ ID N ^o :	Aminoácido, SEQ ID N ^o :
Ta EG_28	Ta cel5A	<i>T. aurantiacus</i>	-	9	10
At EG_40	At cel/45A	<i>A. thermophilum</i>	+	11	12
semelhante a EG_40	At cel/45B	<i>A. thermophilum</i>	-	13	14
Ct EG_54	Ct cel7B	<i>C. thermophilum</i>	+	15	16

A beta-glicosidase pode compreender uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 22, 24 ou 26, ou um fragmento enzimaticamente ativo da mesma. Essas beta-glicosidases possuem boa resistência com relação à inibição de glicose que é vantajosa para evitar inibição do produto final durante hidrólise enzimática do material celulósico. As beta-glicosidases podem também ser usadas na preparação da soforose, um indutor de celulase empregado no cultivo de *T. reesei*.

Beta-glicosidase	Gene	Obtida de	Ácido nucléico, SEQ ID Nº:	Aminoácido, SEQ ID Nº:
Ta BG_81	Ta <i>ce3A</i>	<i>T. aurantiacus</i>	21	22
At BG_101	At <i>ce3A</i>	<i>A. thermophilum</i>	23	24
Ct BG_76	Ct <i>ce3A</i>	<i>C. thermophilum</i>	25	26

A xilanase pode compreender uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 18 ou 20, ou um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

Xilanase	Gene	Obtida de	CBD	Ácido nucléico, SEQ ID Nº:	Aminoácido, SEQ ID Nº:
Xyn_30	Ta xyn10A	<i>T. aurantiacus</i>	+	17	18
Xyn_60	At xyn10A	<i>A. thermophilum</i>	-	19	20

O termo "identidade" significa a identidade global entre duas seqüências de aminoácido comparadas uma com a outra a partir do primeiro aminoácido codificado pelo gene correspondente até o último aminoácido. A identidade das seqüências de comprimento pleno é medida por emprego do programa de alinhamento global Needleman-Wunsch da EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice e outros, 2000) pacote de programas, versão 3.0.0, com os seguintes parâmetros: EMBL62, penalidade de intervalo 10.0, penalidade estendida 0,5. O algoritmo é descrito em Needleman and Wunsch (1970). O versado na técnica está ciente do fato de que, quando se utiliza o algoritmo Needleman-Wunsch, os resultados são comparáveis apenas quando do alinhamento dos domínios correspondentes da seqüência. Conseqüentemente, a comparação, por exemplo, de seqüên-

cias de celulase incluindo CBD ou seqüências de sinal com seqüências que não contêm aqueles elementos não pode ser realizada.

De acordo com uma concretização da invenção é empregado um polipeptídeo celulósico possuindo pelo menos 80, 85, 90, 95 ou 99% de
5 identidade com relação às SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26 ou pelo menos com relação aos seus fragmentos enzimaticamente ativos.

O termo "fragmento enzimaticamente ativo" significa qualquer fragmento de uma seqüência definida que possui atividade celulósica. Em
10 outras palavras, um fragmento enzimaticamente ativo pode ser a parte da proteína madura da seqüência definida ou pode ser apenas um fragmento da parte da proteína madura, contanto que ele ainda tenha atividade de cellobioidrolase, endoglicanase, beta-glicosidase ou xilanase.

As enzimas celulósicas são preferivelmente enzimas recombinantes, que podem ser produzidas de maneira geralmente conhecida. Um
15 fragmento de polinucleotídeo compreendendo o gene da enzima é isolado, o gene é inserido sob um promotor forte em um vetor de expressão, o vetor é transferido para células hospedeiras apropriadas e as células hospedeiras são cultivadas sob condições que provocam a produção da enzima. Os métodos para produção de proteína por tecnologia recombinante em diferentes
20 sistemas de hospedeiro são bem conhecidos na arte (Sambrook e outros, 1989; Coen, 2001; Gellissen, 2005). Preferivelmente, as enzimas são produzidas como enzimas extracelulares que são secretadas no meio de cultura, a partir do qual elas podem ser facilmente recuperadas e isoladas. O meio de cultura gasto do hospedeiro de produção pode ser empregado como tal, ou
25 as células hospedeiras podem ser removidas do mesmo, e/ou ele pode ser concentrado, filtrado ou fracionado. Ele também pode ser seco.

Polipeptídeo isolado no presente contexto pode significar simplesmente que as células e fragmentos de células foram removidos do meio
30 de cultura contendo o polipeptídeo. Convenientemente, os polipeptídeos são isolados, por exemplo, por adição de polímeros aniônicos e/ou catiônicos ao meio de cultura gasto para melhorar a precipitação das células, fragmentos

de células e algumas enzimas que possuem atividades colaterais indesejadas. O meio é então filtrado usando um agente de filtração inorgânico e um filtro para remover os precipitados formados. Após isso, o filtrado é adicionalmente processado usando uma membrana semipermeável para remover o excesso de sais, açúcares e produtos metabólicos.

De acordo com uma concretização da invenção, o polipeptídeo heterólogo compreende um gene semelhante aquele incluído em um microorganismo possuindo número de acesso DSM 16723, DSM 16728, DSM 16729, DSM 16727, DSM 17326, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16724, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

O hospedeiro de produção pode ser qualquer organismo capaz de expressar a enzima celulósica. Preferivelmente, o hospedeiro é uma célula microbiana, mais preferivelmente um fungo. Mais preferivelmente, o hospedeiro é um fungo filamentoso. Preferivelmente, o hospedeiro recombinante é modificado para expressar e secretar enzimas celulósicas como suas atividade principal ou uma de suas atividades principais. Isso pode ser realizado por deleção dos genes secretados homólogos principais, por exemplo, as quatro celulasas principais de *Trichoderma* e por alvejamento dos genes heterólogos para um local que tenha sido modificado para garantir níveis de produção e expressão altos. Os hospedeiros preferidos para produção de enzimas celulósicas são especificamente cepas do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

As enzimas necessárias para a hidrólise do material celulósico de acordo com a invenção podem ser adicionadas em uma quantidade enzimaticamente eficaz tanto simultaneamente por exemplo, na forma de uma mistura de enzimas quanto seqüencialmente ou como parte da sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Qualquer combinação das celobioidrolases compreendendo uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação às SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 ou 8 ou com relação a qualquer fragmento ativo da mesma pode ser empregada em conjunto com qualquer combinação de endoglicanases e beta-glicosidases. Se o material celulósico compreender hemicelulose, hemicelulases, preferivelmente xila-

nases são adicionalmente empregadas para a degradação. As endoglicanases, beta-glicosidasases e xilanases podem ser selecionadas daquelas descritas aqui, porém não estão limitadas às mesmas. Elas também podem ser preparações de enzima comercialmente disponíveis. Além das celulosas e hemicelulasas opcionais, uma ou mais outras enzimas podem ser empregadas, por exemplo, proteases, amilases, lacases, lipases, pectinases, esterases e/ou peroxidases. Outro tratamento da enzima pode ser realizado antes, durante ou após o tratamento da celulase.

O termo "preparação de enzima" refere-se a uma composição compreendendo pelo menos uma das enzimas desejadas. A preparação pode conter as enzimas na forma parcialmente purificada e isolada. Ela pode consistir essencialmente em uma enzima ou enzimas desejadas. Alternativamente, a preparação pode ser um meio de cultura gasto ou filtrado contendo uma ou mais enzimas celulósicas. Além da atividade celulósica, a preparação pode conter aditivos, tais como, mediadores, estabilizadores, tampões, conservantes, agentes tensoativos e/ou componentes de meio de cultura. Os aditivos preferidos são aqueles que são geralmente usados nas preparações de enzima destinadas a uma aplicação específica. A preparação da enzima pode ser na forma de líquido, pó ou granulado. Preferivelmente, a preparação da enzima é o meio de cultura gasto. "Meio de cultura gasto" refere-se ao meio de cultura do hospedeiro compreendendo as enzimas produzidas. Preferivelmente, as células hospedeiras são separadas do meio após a produção.

De acordo com uma concretização da invenção a preparação da enzima compreende uma mistura de CBH, EG e BG, opcionalmente em conjunto com xilanase e/ou outras enzimas. A CBH compreende uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação às SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 ou 8 ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma, e pode ser obtida de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum*, ou *Chaetomium thermophilum*, considerando-se que EG, BG e xilanase podem ser de qualquer origem incluindo de outros organismos. Outras enzimas que podem estar presentes na preparação são, por

exemplo, proteases, amilases, lacases, lipases, pectinases, esterases e/ou peroxidases.

Diferentes misturas de enzima e combinações podem ser usadas para se adequarem à diferentes condições de processo. Por exemplo, se o processo de degradação for realizado em uma temperatura alta, as enzimas termoestáveis serão escolhidas. Uma combinação de uma CBH da família 7 com uma endoglicanase da família 45, opcionalmente em combinação com uma BG da família 3 e/ou uma xilanase da família 10 possui excelente desempenho de hidrólise ambas a 45°C e em temperaturas elevadas.

Enzimas celulósicas de *Trichoderma reesei* são convenientemente empregadas em temperaturas na faixa de cerca de 40-50°C na hidrólise e a 30-40°C em SFF. CBH, EG, BG e Xin obtidas de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum* são eficazes nessas temperaturas também, porém além disso, a maioria delas também funciona muito bem em temperaturas entre 50°C e 75°C, ou mesmo até 80°C e 85°C, tais como entre 55°C e 70°C, por exemplo entre 60°C e 65°C. Para tempos de incubação curtos, misturas de enzima são funcionais até mesmo a 85°C, para hidrólise completa temperaturas mais baixas são normalmente empregadas.

O método para tratar material celulósico com CBH, EG, BG e Xin é especialmente apropriado para produção de açúcares fermentados de material lignocelulósico. Os açúcares fermentados podem então ser fermentados por levedura em etanol e usados como combustível. Eles também podem ser usados como intermediários ou matérias-primas para a produção de várias substâncias químicas ou blocos de construção para os processos da indústria química, por exemplo, na assim chamada biorrefinaria. O material lignocelulósico pode ser pré-tratado antes da hidrólise enzimática, para fragmentar a estrutura da fibra dos substratos celulósicos e tornar a fração de celulose mais acessível às enzimas celulósicas. Os pré-tratamentos correntes incluem processos mecânicos, químicos ou térmicos e combinações dos mesmos. O material pode ser tratado, por exemplo, por explosão de vapor ou hidrólise de ácido.

Vários polipeptídeos celulósicos foram encontrados em *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum*, e *Chaetomium thermophilum*.

Os novos polipeptídeos podem compreender um fragmento possuindo atividade celulósica e serem selecionados do grupo consistindo em um poli-

5 peptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 66%, preferivelmente 70% ou 75% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 4, 79% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 6, 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 12, 68%, preferivelmente 70% ou 75% de identidade em relação à SEQ ID Nº: 14, 72%, preferivelmente 75% de identidade
10 em relação à SEQ ID Nº: 16, 68%, preferivelmente 70% ou 75% de identidade em relação à SEQ ID Nº: 20, 74% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 22 ou 24, ou 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 26.

Os novos polipeptídeos também podem ser variantes dos ditos polipeptídeos. Uma "variante" pode ser um polipeptídeo que ocorre naturalmente, por exemplo, como uma variante alélica dentro da mesma cepa, espécie ou gênero, ou pode ter sido gerada por mutagênese. Ela pode compreender substituições, deleções ou inserções de aminoácido, porém ainda funciona de modo substancialmente semelhante às enzimas definidas acima, isto é, ela compreende um fragmento possuindo atividade celulósica.

20 Os polipeptídeos celulósicos são geralmente produzidos na célula como polipeptídeos imaturos compreendendo uma sequência de sinal que é clivada durante a secreção da proteína. Eles também podem ser adicionalmente processados durante secreção, na extremidade N-terminal e/ou C-terminal para fornecer uma proteína madura, enzimaticamente ativa. Um
25 polipeptídeo "compreendendo um fragmento possuindo atividade celulósica" significa que o polipeptídeo pode estar tanto na forma imatura quanto madura, preferivelmente está na forma madura, isto é, quando o processamento já aconteceu.

Os novos polipeptídeos podem ser, adicionalmente, um "fragmento dos polipeptídeos ou variantes" mencionados acima. O fragmento
30 pode ser a forma madura das proteínas mencionadas acima ou pode ser apenas uma parte enzimaticamente ativa da proteína madura. De acordo

com uma concretização da invenção, o polipeptídeo possui uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80, 85, 90, 95 ou 99% de identidade com relação às SEQ ID N^{os}: 4, 6, 12, 14, 16, 20, 22, 24 ou 26 ou com relação a um fragmento celulosicamente ativo da mesma. Pode também ser
5 uma variante do mesmo, ou um fragmento do mesmo possuindo atividade de celobioidrolase, endoglicanase, xilanase ou beta-glicosidade. De acordo com outra concretização da invenção, o polipeptídeo consiste essencialmente em um fragmento celulosicamente ativo de uma sequência das SEQ ID N^{os}: 4, 6, 12, 14, 16, 20, 22, 24 ou 26.

10 Os novos polinucleotídeos podem compreender uma sequência de nucleotídeo das SEQ ID N^{os}: 3, 5, 11, 13, 15, 19, 21, 23 ou 25, ou uma sequência codificando um novo polipeptídeo conforme definido acima, incluindo filamentos complementares do mesmo. Os polinucleotídeos conforme usados aqui referem-se a ambos RNA e DNA podendo ser de filamento simples ou
15 duplo. O polinucleotídeo pode também ser um fragmento dos polinucleotídeos compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos, por exemplo, pelo menos 25, 30 ou 40 nucleotídeos. De acordo com uma concretização da invenção ele possui pelo menos 100, 200 ou 300 nucleotídeos de comprimento. Adicionalmente, os polinucleotídeos podem ser degenerados como resultado do código genético em qualquer uma das sequências conforme definido acima. Isso sig-
20 nifica que códons diferentes podem codificar o mesmo aminoácido.

De acordo com uma concretização da invenção o polinucleotídeo é "compreendido" das SEQ ID N^{os}: 3, 5, 11, 13, 15, 19, 21, 23 ou 25, o que significa que a sequência possui pelo menos parte da sequência men-
25 cionada. De acordo com outra concretização da invenção, o polinucleotídeo compreende um gene semelhante ao incluído em um microorganismo possuindo número de acesso DSM 16728, DSM 16729, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

As novas proteínas/polipeptídeos podem ser preparados con-
30 forme descrito acima. Os novos polinucleotídeos podem ser inseridos em um vetor, que é capaz de expressar o polipeptídeo codificado pela sequência heteróloga, e o vetor pode ser inserido na célula hospedeira de expressão

do dito polipeptídeo. A célula hospedeira é preferivelmente do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

O gene heterólogo codificando os novos polipeptídeos foi introduzido em um plasmídeo em uma cepa *Escherichia coli* possuindo número de acesso DSM 16728, DSM 16729, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

As novas enzimas podem ser componentes de uma preparação de enzima. A preparação de enzima pode compreender um ou mais dos novos polipeptídeos e pode estar, por exemplo, na forma de meio de cultura gasto, pó, grânulos ou líquido. De acordo com uma concretização da invenção a mesma compreende atividade de celobioidrolase, endoglicanase, beta-glicosidade e opcionalmente atividade de xilanase e/ou outras atividades de enzima. A mesma pode compreender, adicionalmente, quaisquer aditivos convencionais.

As novas enzimas podem ser aplicadas em qualquer processo envolvendo enzimas celulósicas, tais como, em combustível, têxteis, detergente, polpa e papel, alimentos, indústria de suprimentos ou bebidas, e especialmente na hidrólise de material celulósico para a produção de biocombustível compreendendo etanol. Na indústria de polpa e papel, elas podem ser usadas para modificar a fibra celulósica, por exemplo, no tratamento da polpa kraft, tratamento mecânico da polpa ou papel reciclado.

A invenção é ilustrada pelos seguintes exemplos não limitantes. Deve ser entendido, contudo, que as concretizações fornecidas na descrição anterior e nos exemplos são para fins ilustrativos e que várias alterações e modificações são possíveis dentro do escopo da invenção.

Exemplos

Exemplo 1. Classificação de cepas expressando atividade celulósica e seu cultivo para purificação

Cerca de 25 cepas de fungos da Roal Oy Culture Collection foram testadas quanto a atividade celulósica incluindo beta-glicosidases. Após classificação preliminar seis cepas foram escolhidas para estudos adicionais. Elas eram *Thermoascus aurantiacus* ALKO4239 e ALKO4242, *Acremonium*

thermophilum ALKO4245, *Talaromyces thermophilus* ALKO4246 e *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 e ALKO4265.

As cepas ALKO4239, ALKO4242 e ALKO4246 foram cultivadas em frascos de agitação a 42°C por 7 dias no meio 3 x B, que contém g/litro:

- 5 Celulose Solka Floe 18, grão 18 gasto do destilador, xilana 9 de aveia e espelta, CaCO_3 2, carne de soja 4,5, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ 4,5, farelo de trigo 3,0, KH_2PO_4 1,5, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5, NaCl 0,5, KNO_3 0,9, goma de alfarroba 9,0, solução de elemento de traço #1 0,5, solução de elemento de traço #2 0,5 e Struktol (Stow, OH, USA) antiespumante 0,5 mL; o pH foi ajustado para 6,5.
- 10 Solução de elemento de traço #1 possui g/litro: MnSO_4 1,6, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,45 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,0; solução de elemento de traço #2 possui g/litro: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0 com duas gotas de H_2SO_4 concentrado.

- A cepa ALKO4261 foi cultivada em frascos de agitação no meio 1 x B, que possui um terço de cada um dos constituintes do meio 3 x B (acima, exceto que possui as mesmas concentrações de CaCO_3 , NaCl e os elementos de traço. A cepa foi cultivada a 45°C por 7 dias.
- 15

- A cepa ALKO4265 foi cultivada em frascos de agitação no meio que se segue, g/L: celulose Solka Floe 40, Pharmamedia™ (Traders Protein, Memphis, TN, USA) 10, pó impregnado com milho 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 e KH_2PO_4 15; o pH foi ajustado para 6,5. A cepa foi cultivada a 45°C por 7 dias.
- 20

- Após o cultivo, as células e outros sólidos foram coletados por centrifugação e o sobrenadante foi recuperado. Para os cultivos de frasco com agitação, os inibidores de protease PMSF (fluoreto de fenilmetil-sulfonila) e pepstatina A foram adicionados a 1 mM e 10 µg/mL, respectivamente. Se não forem usadas imediatamente, as preparações serão armazenadas em alíquotas a -20°C.
- 25

- Para a estimativa da atividade térmica das enzimas, foram realizados ensaios de preparações de cultivo em frasco de agitação a 50°C, 60°C, 65°C, 70°C e 75°C por 1 hora, na presença de 100 µg albumina de soro bovino (BSA)/mL como um estabilizador. Ensaios preliminares foram realizados a 50°C e 65°C em dois valores de pH diferentes (4,8/5,0 ou 6,0) de modo a tornar claro qual pH seria mais apropriado ao ensaio de atividade térmica.
- 30

Todos os sobrenadantes do frasco de agitação foram ensaiados quanto às seguintes atividades:

Atividade semelhante à Celobioidrolase I ('CBHI') e atividade semelhante à endoglicanase I ('EGI'):

- 5 Essas foram medidas em um tampão de acetato de Nas 40 mM com 0,5 mM de MUL (4-metilumbeliferil-beta-D-lactosídeo) como o substrato. Glicose (100 mM) foi adicionada para inibir qualquer interferência na atividade da beta-glicosidase. 4-metilumbeliferila liberada foi medida a 370 nm. α atividades da 'CBHI' e da 'EGI' foram distinguidas por medição da atividade na presença e ausência de celobiose (5 mM). A atividade que não é inibida pela celobiose representa a atividade da 'EGI' e o restante da atividade de MUL representa a atividade da 'CHBI' (van Tilbeurgh e outros, 1988). O ensaio foi realizado em pH 5,0 ou 6,0 (vide a seguir).

A atividade da endoglicanase (CMCase):

- 15 Essa foi ensaiada com 2% (peso/volume) de carboximetilcelulose (CMC) como o substrato em 50 mM e tampão citrato essencialmente conforme descrito por Bailey e Nevalainen 1981; Haakana e outros. 2004. Os açúcares de redução foram medidos com o reagente de DNS. O ensaio foi realizado em pH 4,8 ou 6,0 (vide a seguir).

- 20 Atividade da beta-glicosidase (BGU):

Essa foi ensaiada com 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (1 mM) em 50 mM de tampão citrato conforme descrito por Bailey e Nevalainen 1981. O 4-nitrofenol liberado foi medido a 400 nm. O ensaio foi realizado em pH de 4,8 ou 6,0 (vide a seguir).

- 25 As atividades relativas das enzimas são apresentadas na figura 1. As atividades relativas foram apresentadas por ajuste da atividade a 60°C como 100% (figura 1). Todas as cepas produziram enzimas que possuíam alta atividade em temperaturas altas (65°C-75°C).

- 30 Para purificações da proteína, a ALKO4242 também se desenvolveu em um bioreator de 2 litros (Braun Biostat^(R) B, Braun, Melsungen, Alemanha) no meio que se segue, g/litro: celulose Solka Floc 40, carne de soja 10, NH_4NO_3 5, KH_2PO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05, solução

de elemento de traço #1 0,5, solução de elemento de traço #2 0,5. A aeração foi de 1 vvm, controle do antiespumante com Struktol, agitação a 200-800 rpm e temperatura a 47°C. Duas bateladas foram operadas, uma em pH $4,7 \pm 0,2$ ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) e a outra com pH inicial de 4,5. O tempo de cultivo foi de 7 dias. Após o cultivo as células e outros sólidos foram removidos por centrifugação.

A cepa ALKO4245 foi desenvolvida em bioreator de 2 litros (Braun Biostat^(R) B, Braun, Melsungen, Alemanha) no meio que se segue, g/litro: celulose Solka Floe 40, pó impregnado com milho 15, grão 5 gasto do destilador, xilana 3 de aveia e espelta, goma de alfarroba 3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 . A faixa do pH foi de $5,2 \pm 0,2$ ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), aeração 1 vvm, agitação 300-600 rpm, controle antiespuma com Struktol e a temperatura a 42°C. O tempo de cultivo foi de 4 dias. Após o cultivo as células e outros sólidos foram removidos por centrifugação.

Para purificação da enzima, ALKO4261 foi desenvolvida em um bioreator de 10 litros (Braun Biostat^(R) ED, Braun, Melsungen, Alemanha) no meio que se segue, g/litro: celulose Solka Floe 30, grão 10 gasto no destilador, xilana 5 de aveia e espelta, CaCO_3 2, carne de soja 10, farelo de trigo 3,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, KH_2PO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, NaCl 0,5, KNO_3 0,3, solução de elemento de traço #1 0,5 e solução de elemento de traço #2 0,5. A faixa de pH era de $5,2 \pm 0,2$ ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), aeração de 1 vvm, agitação de 200-600 rpm, controle de antiespumante com Struktol e a temperatura de 42°C. O tempo de cultivo foi de 5 dias. Uma segunda batelada foi desenvolvida sob condições semelhantes, exceto que Solka Floe foi adicionada a 40 g/L e o grão gasto a 15 g/L. Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação e filtração através de filtros Seitz- K 150 and EK (Pall SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemanha). O último sobrenadante foi concentrado cerca de dez vezes usando o sistema de ultrafiltração Pellicon mini (filtro NMWL 10 kDa; Millipore, Billerica, MA, USA).

Para purificação da enzima, ALKO4265 também se desenvolveu em um bioreator de 10 litros (Braun Biostat^(R) ED, Braun, Melsungen, Alemanha) no mesmo meio como acima, exceto que KH_2PO_4 foi adicionado a

2,5 g/L. A faixa de pH era de $5,3 \pm 0,3$ ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$), aeração de 0,6 vvm, agitação de 500 rpm, controle de antiespumante com Struktol e a temperatura de 43°C. O tempo de cultivo foi de 7 dias. Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação e filtração através de filtros Seitz-K 150 and EK (Pall SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemanha). O último sobrenadante foi concentrado cerca de vinte vezes usando o sistema de ultrafiltração Pellicon mini (filtro NMWL 10 kDa; Millipore, Billerica, MA, USA).

Exemplo 2. Purificação e caracterização de celobioidrolases a partir de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 e *Chaetomium thermophilum* ALKO4265

Acremonium thermophilum ALKO4245 e *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 se desenvolveram conforme descrito no Exemplo 1. As celobioidrolases principais foram purificadas empregando a coluna de afinidade com base em *p*-aminobenzil 1-tio- β -celobiosídeo, preparada conforme descrito por Tomme e outros, 1988.

Os sobrenadantes de cultura foram primeiro tamponados em 50 mM de tampão de acetato de sódio, pH 5,0, contendo 1 mM de δ -gliconolactona e 0,1 M de glicose a fim de retardar a hidrólise do ligante na presença de β -glicosidases. As celobioidrolases foram eluídas com 0,1 M de lactose e finalmente purificadas por filtração com cromatografia de gel empregando colunas Superdex 200 HR 10/30 no sistema AKTA (Amersham Pharmacia Biotech). O tampão empregado na filtração com gel era fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo cloreto de sódio 0,15 M.

Celobioidrolases purificadas foram analisadas por SDS-eletroforese de gel poliacrilamida e a massa molecular de ambas as proteínas foi determinada como sendo de aproximadamente 70 kDa, avaliada com base no padrão de massa molecular (Low molecular weight calibration kit, Amersham Biosciences). As celobioidrolases *Acremonium* e *Chaetomium* foram denominadas como At Cel7A e Ct Cel7A, respectivamente, seguindo-se o esquema em Henrissat e outros. (1998) (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993).

A atividade específica das preparações foi determinada empre-

gando 4- metilumbeliferil- β -D-lactosídeo (MUL), 4-metilumbeliferil- β -D-celobiosídeo (MUG2) ou 4-metilumbeliferil- β -D-celotriosídeo (MUG3) como o substrato (van Tilbeurgh e outros, 1988) em 0,05 M tampão de citrato de sódio pH 5 a 50°C por 10 min. As atividades da endoglicanase e xilanase foram determinadas por procedimentos padrão (de acordo com IUPAC, 1987) empregando carboximetil celulose (CMC) e glicuronoxilana de bétula (Bailey e outros, 1992) como o substratos. A atividade específica contra Avicel foi calculada com base nos açúcares de redução formados em uma reação de 24 horas a 50°C, pH 5,0, com substrato a 1% e dosagem de enzima de 0,25 μ M. O teor da proteína das preparações de enzima purificadas foi medido de acordo com Lowry e outros, 1951. De modo a caracterizar os produtos finais de hidrólise, açúcares solúveis liberados em experimento de hidrólise de 24 horas, conforme descrito acima, foram analisados por HPLC (Dionex). Celobiodrolase I purificada (CBHI/Cel7A) do *Trichoderma reesei* foi empregada como uma referência.

As atividades específicas das enzimas purificadas e aquela de *T.reesei* CBHI/Cel7A são apresentadas na Tabela 1. As celobiodrolases At Cel7A e Ct Cel7A possuem atividades específicas maiores contra substratos sintéticos pequenos, quando comparadas à *T.reesei* CBHI/Cel7A. A atividade específica contra Avicel foi claramente maior com as enzimas reveladas aqui. Atividades baixas das preparações da enzima purificada contra xilana e CMC podem tanto ser devidas às proteínas propriamente, quanto pelo menos parcialmente às quantidades menores restantes das enzimas de contaminação. O produto final principal de hidrólise da celulose por todas enzimas purificadas foi celobiose que é típica das celobiodrolases.

Tabela 1. Atividades específicas (nkat/mg) das celobioidrolases purificadas e a enzima de referência de *T. reesei* (50°C, pH 5,0, 24 horas).

Substrato	<i>A. thermophilum</i> ALKO4245 Cel7A	<i>C. thermophilum</i> ALKO4265 Cel7A	<i>T. reesei</i> Cel7A
Xilana	11,3	6,7	1,3
CMC	26,2	5,5	1,0
MUG2	9,2	18,9	4,3
MUG3	1,3	1,5	0,9
MUL	21,5	54,0	21,9
Avicel	1,8	1,4	0,6

A estabilidade térmica das celobioidrolases purificadas foi determinada em temperaturas diferentes. A reação foi realizada na presença de 0,1% BSA em pH 5,0 por 60 minutos empregando 4-metilumbeliferil- β -D-lactosídeo como o substrato. CBH/Cel7A de *C. thermophilum* ALKO4265 e CBH/Cel7A de *A. thermophilum* ALKO4245 foram estáveis até 65°C e 60°C, respectivamente. A enzima de referência *T. reesei* (CBH/Cel7A) reteve 100% da atividade até 55°C.

10 Exemplo 3. Purificação e caracterização de uma endoglicanase a partir de *Acremonium thermophilum* ALKO4245

15 *Acremonium thermophilum* ALKO4245 foi desenvolvida conforme descrito no Exemplo 1. O sobrenadante da cultura foi incubado a 70°C por 24 horas, após o que foi concentrado por ultrafiltração. A endoglicanase pura foi obtida por purificação seqüencial com interação hidrófoba e cromatografia de troca de cátion seguido por filtração com gel. A atividade de endoglicanase das frações coletadas durante purificação foi determinada empregando carboximetil celulose (CMC) como o substrato (procedimento do IUPAC 1987). O teor da proteína foi medido por Kit de Ensaio BioRad (Bio-
20 Rad Laboratories) empregando albumina de soro bovino como padrão.

O sobrenadante de cultura concentrado foi aplicado a uma coluna de interação hidrófoba HiPrep 16/10 Butyl FF, equilibrada com 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 1 M (NH₄)₂SO₄. As proteínas ligadas foram eluídas com o gradiente linear a partir do tampão acima para 5

mM de fosfato de potássio, pH 6,0. As frações foram coletadas e a atividade de endoglicanase foi determinada conforme descrito acima. A atividade de endoglicanase foi eluída em uma área de condutividade ampla de 120 a 15 mS/cm.

5 Frações combinadas foram aplicadas a uma coluna de troca de cátion HiTrap SP XL equilibrada com um gradiente linear de 0 a 0,25 M NaCl no tampão de equilíbrio. A atividade de endoglicanase contendo proteína foi eluída na área de condutividade de 3-7 mS/cm. Cromatografia de troca de cátion foi repetida e o eluato de proteína foi concentrado por liofilização.

10 A amostra dissolvida foi carregada em uma coluna de filtração de gel Superdex 75 HR10/30 equilibrada com 20 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0, contendo 0,15 M de NaCl. A fração da proteína principal foi eluída da coluna com o volume de retenção de 13,3 mL. O eluato da proteína foi tido como sendo puro por SDS-eletroforese de gel de poliacrilamida e
15 o peso molecular foi avaliado como sendo de 40 kDa. A atividade específica da proteína purificada, denominada como At EG-40, a 50°C foi determinada como sendo de 450 nkat/mg (procedimento do IUPAC 1987, empregando CMC como o substrato).

A estabilidade térmica da endoglicanase purificada foi determi-
20 nada em temperaturas diferentes. A reação foi realizada na presença de 0,1 mg/mL BSA em pH 5,0 por 60 minutos empregando carboximetil celulose como o substrato. EG-40/Cel45A de *A. thermophilum* foi estável até 80°C. As enzimas de referência de EGI (Cel7B) e EGII (Cel5A) *T. reesei* manteve-ram 100% de atividade até 60°C e 65°C, respectivamente.

25 **Exemplo 4. Purificação de uma endoglicanase a partir *Chaetomium thermophilum* ALKO4261**

Chaetomium thermophilum ALKO4261 foi desenvolvida confor-
me descrito no Exemplo 1. A endoglicanase pura foi obtida por purificação
seqüencial com interação hidrófoba e cromatografia de troca de cátion se-
30 guido por filtração com gel. A atividade de endoglicanase das frações cole-
tadas durante purificação foi determinada empregando carboximetil celulose
(CMC) como o substrato (procedimento do IUPAC 1987).

Sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante da cultura para alcançar a mesma condutividade como 20 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A amostra foi aplicada a uma coluna de interação hidrofóbica HiPrep 16/10 Phenyl FF equilibrada com 20 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A eluição foi realizada com um gradiente linear de 20 a 0 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, seguido por 5 mM de fosfato de potássio, pH 6,0 e água. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente linear de 0 a 6 M de uréia. As frações foram coletadas e a atividade da endoglicanase foi analisada conforme descrito acima. A proteína contendo atividade de endoglicanase foi eluída no começo do gradiente de uréia.

As frações foram combinadas, equilibradas para 16 mM Tris-HCl pH 7,5 ($I = 1,4 \text{ mS/cm}$) por coluna 10DG (Bio-Rad) e aplicadas a uma coluna de troca de ânion HiTrap DEAE FF com 20 mM Tris-HCl, pH 7,5. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente linear de 0 a 1 M NaCl no tampão de equilíbrio. As frações foram coletadas e analisadas quanto a atividade de endoglicanase conforme descrito acima. A proteína foi eluída na faixa de 10-20 mS/cm.

A amostra foi equilibrada para 15 mM acetato de sódio, pH 4,5 por coluna 10DG (Bio-Rad) e aplicada a uma coluna de troca de cátion HiTrap SP XL equilibrada com 20 mM de acetato de sódio, pH 4,5. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de 0 a 0,4 M de acetato de sódio, pH 4,5. A atividade da endoglicanase foi avaliada na faixa de 1-10 mS/cm. A amostra coletada foi liofilizada.

A amostra foi dissolvida em água e aplicada a uma coluna de filtração de gel Superdex 75 HR 10/30 equilibrada com fosfato e sódio 20 mM pH 6,0, contendo 0,15 M de NaCl. As frações foram coletadas e aquelas contendo atividade de endoglicanase foram combinadas. O eluído da proteína foi tido como sendo puro por SDS-eletroforese de gel poliacrilamida e a massa molecular foi avaliada com base no padrão de massa molecular (padrão SDS-PAGE pré-colorido, Faixa Ampla, Bio-Rad) como sendo de 54 kDa. O pI da proteína purificada, denominada como Ct EG-54 foi determina-

do com PhastSystem (Pharmacia) como sendo de cerca de 5,5.

Exemplo 5. Purificação de uma endoglicanase a partir de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Thermoascus aurantiacus ALKO4242 foi desenvolvida conforme descrito no Exemplo 1. A endoglicanase pura foi obtida por purificação se-
5 quencial com interação hidrófoba e cromatografia de troca de ânion seguido por filtração com gel. A atividade de endoglicanase das frações coletadas durante purificação foi determinada empregando carboximetil celulose (CMC) como o substrato (procedimento do IUPAC 1987). O teor da proteína
10 foi medido pelo Kit de Ensaio BioRad (Bio-Rad Laboratories) empregando albumina de soro bovino como padrão.

O sobrenadante da cultura foi aplicado a uma coluna de interação hidrófoba HiPrep 16/10 Butyl equilibrada com 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As proteínas ligadas foram
15 eluídas com 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($I = 39 \text{ mS/cm}$). As frações contendo atividade de endoglicanase foram combinadas e concentradas por ultrafiltração.

A amostra foi dessalinizada em colunas 10DG (Bio-Rad) e aplicada a uma coluna de troca de ânion HiTrap DEAE FF equilibrada com 15 mM Tris- HCL, pH 7,0. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente
20 linear de 0 a 0,4 M NaCl no tampão de equilíbrio. A proteína contendo atividade de endoglicanase foi eluída na área de condutividade de 15-21 mS/cm. Frações coletadas foram combinadas e concentradas como acima.

A amostra foi aplicada a uma coluna de filtração de gel Sephacryl S-100 HR 26/60, equilibrada com 50 mM de tampão acetato de sódio,
25 pH 5,0, contendo 0,05 M de NaCl. A fração de proteína contendo atividade de endoglicanase foi eluída da coluna com um volume de retenção correspondendo a um peso molecular de 16 kDa. As frações coletadas foram combinadas, concentradas e a filtração do gel foi repetida. O eluído da proteína foi julgado como sendo puro por SDS-eletroforese de gel de poliacrilamida e
30 o peso molecular foi avaliado como sendo de 28 kDa. O pI da proteína purificada, denominada como Ta EG-28, foi determinado em um gel IEF (PhastSystem, Pharmacia) como sendo de cerca de 3,5. A atividade especí-

fica de Ta EG-28 a 50°C foi determinada como sendo de 4290 nkat/mg (procedimento do IUPAC 1987, empregando CMC como o substrato).

Exemplo 6. Purificação e caracterização de uma β -glicosidase a partir de *Acremonium thermophilum* ALKO4245

5 *Acremonium thermophilum* ALKO4245 foi desenvolvida conforme descrito no Exemplo 1. A β -glicosidase pura foi obtida por purificação sequencial com interação hidrófoba e cromatografia de troca de ânion seguido por filtração com gel. A atividade da β -glicosidase das frações coletadas durante purificação foi determinada empregando 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como o substrato (Bailey and Linko, 1990). O teor da proteína foi medido pelo Kit de Ensaio BioRad (Bio-Rad Laboratories) empregando albumina de soro bovino como padrão.

10 O sobrenadante da cultura foi aplicado a uma coluna de interação hidrófoba HiPrep 16/10 Phenyl Sepharose FF, equilibrada com 20 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente linear do tampão de equilíbrio para 5 mM de fosfato de potássio na área de condutividade 137-16 mS/cm. As frações coletadas foram combinadas e concentradas por ultrafiltração.

15 A amostra foi dessalinizada em colunas 10DG (Bio-Rad) e aplicada a uma coluna de troca de ânion de HiTrap DEAE FF equilibrada com 10 mM de fosfato de potássio pH 7,0. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente linear a partir do tampão de equilíbrio para ao mesmo tampão contendo 0,25 M de NaCl na área de condutividade de 1,5-12 mS/cm. Cromatografia de troca de ânion foi repetida como acima, exceto que 4 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,2, foram usados. As proteínas foram eluídas na área de condutividade de 6-9 mS/cm. As frações contendo atividade de β -glicosidase foram coletadas, combinadas e concentradas.

20 O material ativo da cromatografia de troca de ânion foi aplicado a uma coluna Sephacryl S-300 HR 26/60 equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio, pH 6,5 contendo 0,15 M de NaCl. A proteína com atividade de β -glicosidase foi eluída com um volume de retenção correspondendo a um pe-

so molecular de 243 kDa. A proteína foi considerada pura por SDS-eletroforese de gel de poliacrilamida e o peso molecular foi avaliado como sendo de 101 kDa. O pI da proteína purificada, denominada como At β G-101, foi determinado em um gel IEF (PhastSystem, Pharmacia) como estando na área de 5,6-4,9. A atividade específica de At β G-101 a 50°C foi determinada como sendo de 1.100 nkat/mg (empregando 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como o substrato, Bailey and Linko, 1990).

A estabilidade térmica da β -glicosidase purificada foi determinada em temperaturas diferentes. A reação foi realizada na presença de 0,1 mg/mL BSA em pH 5,0 por 60 minutos, empregando 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como o substrato. β G-101 de *A. thermophilum* foi estável até 70°C. A enzima de referência *Aspergillus* (Novozym 188) manteve 100% de atividade até 60°C.

Exemplo 7. Purificação de uma β -glicosidase a partir de *Chaetomium thermophilum* ALKO4261

Chaetomium thermophilum ALKO4261 foi desenvolvido conforme descrito no Exemplo 1. A β -glicosidase pura foi obtida por purificação sequencial com interação hidrófoba, cromatografia de troca de ânion e de cátion seguido por filtração com gel. A atividade da β -glicosidase das frações coletadas durante purificação foi determinada empregando 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como o substrato (Bailey and Linko, 1990).

O sobrenadante da cultura foi aplicado a uma coluna de interação HiPrep 16/10 Phenyl Sepharose FF equilibrada com 20 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A eluição foi realizada com um gradiente linear do tampão de equilíbrio para 3 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, seguido por eluição com água e 6 M de uréia. As primeiras frações com atividade β -glicosidase foram eluídas na área de condutividade de 80-30 mS/cm. A segunda atividade da β -glicosidase foi avaliada com 6M uréia. As frações ativadas eluídas por uréia foram agrupadas e dessalinizadas em colunas 10DG (Bio-Rad) equilibradas com 10 mM de Tris-HCl em pH 7,0.

Após dessalinização, a amostra foi aplicada a uma coluna de

troca de ânion HiTrap DEAE FF equilibrada com 15 mM de Tris-HCl, pH 7,0. A proteína não se ligou à coluna, porém foi eluída durante a alimentação da amostra. Essa fração de fluxo atravessante foi dessalinizada em colunas de 10DG (Bio-Rad) equilibradas com 7 mM de acetato de Na, pH 4,5.

5 A amostra da cromatografia de troca de ânion foi aplicada a uma coluna de troca de cátion HiTrap SP FF equilibrada com 10 mM de acetato de sódio, pH 4,5. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente linear de 10 mM a 400 mM de acetato de sódio, pH 4,5. As frações com atividade de β -glicosidase eluindo na área de condutividade de 6,5-12 mS/cm foram
10 coletadas, dessalinizadas em colunas 10DG (Bio-Rad) equilibradas com 7 mM de acetato de sódio, pH 4,5 e secas por congelamento.

A amostra liofilizada foi diluída a 100 μ L de água e aplicada a uma coluna de filtração de gel Superdex 75 HF10/30 equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio, pH 4,5, contendo 0,15 M de NaCl. A atividade da β -
15 glicosidase foi eluída em um volume de retenção de 13,64 mL. Frações coletadas foram combinadas, liofilizadas e dissolvidas em água. A proteína foi considerada pura por SDS-eletroforese de gel de poliacrilamida e o peso molecular foi avaliado como sendo de 76 kDa. A proteína foi denominada como Ct β G-76.

20 **Exemplo 8. Purificação e caracterização de uma β -glicosidase a partir de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242**

Thermoascus aurantiacus ALKO4242 foi desenvolvido conforme descrito no Exemplo 1. A β -glicosidase pura foi obtida por purificação sequencial com interação hidrófoba, cromatografia de troca de cátion e ânion
25 seguido por filtração com gel. A atividade da β -glicosidase das frações coletadas durante purificação foi determinada empregando 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como o substrato (Bailey and Linko, 1990). O teor da proteína foi medido pelo Kit de Ensaio BioRad (Bio-Rad Laboratories) empregando albumina de soro bovino como padrão.

30 O sobrenadante da cultura foi aplicado a uma coluna de interação HiPrep 16/10 Phenyl Sepharose FF equilibrada com 20 mM fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As proteínas ligadas foram elu-

idas com um gradiente linear de 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 5 mM fosfato de potássio, pH 6,0. A atividade da β -glicosidase foi eluída durante o gradiente na área de condutividade de 28,0-1,1 mS/cm. As frações foram combinadas e concentradas por ultrafiltração.

5 A amostra foi dessalinizada em colunas de 10DG (Bio-Rad) e aplicada a uma coluna de troca de ânion HiTrap DEAE FF equilibrada com 20 mM de Tris-HCl pH 7,0. A enzima foi eluída com um gradiente linear de 0 a 0,2 M NaCl no tampão de equilíbrio e com eluição retardada por 20 mM de Tris-HCl contendo 0,4 M NaCl. A amostra eluindo na área de condutividade
10 de cerca de 10-30 mS/cm foi concentrada por ultrafiltração e dessalinizada por coluna de 10DG (Bio-Rad).

A amostra foi aplicada a uma coluna de troca de cátion HiTrap SP XL equilibrada com 9 mM de acetato de sódio, pH 4,5. A enzima foi eluída com um gradiente linear de 10 mM a 400 mM de NaAc e por eluição retardada empregando 400 mM de NaAc pH 4,5. As proteínas com atividade
15 de β -glicosidase foram eluídas amplamente durante o gradiente linear na área de condutividade de 5,0-11,3 mS/cm.

O material ativo da cromatografia de troca de cátion foi aplicado a uma coluna Sephacryl S-300 HR 26/60 equilibrada com 20 mM de fosfato de sódio, pH 7,0, contendo 0,15M de NaCl. A proteína com atividade de β -
20 glicosidase foi eluída com um volume de retenção correspondendo a um peso molecular de 294 kDa. As frações coletadas foram combinadas, liofilizadas e dissolvidas em água. A proteína foi considerada pura por SDS-eletroforese de gel de poliacrilamida e o peso molecular foi avaliado como
25 sendo de 81 kDa representando mais provavelmente a forma monomérica da proteína. O focalização isoeletrica (IEF) foi realizada usando um gel 3-9 pl. Após coloração com prata, uma área ampla acima de pl 5,85 foi colorida além de uma faixa estreita correspondendo a pl 4,55. A atividade específica da proteína purificada denominada como Ta β G-81 a 50°C foi determinada
30 como sendo de 600 nkat/mg empregando 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como o substrato (Bailey and Linko, 1990).

A estabilidade térmica da β -glicosidase purificada foi determina-

da em temperaturas diferentes. A reação foi realizada na presença de 0,1 mg/mL BSA em pH 5,0 por 60 minutos, empregando 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como o substrato. *T. aurantiacus* β G-81 foi estável até 75°C. A enzima de referência *Aspergillus* (Novozym 188) manteve 100% de atividade até 60°C.

Exemplo 9. Purificação de uma xilanase a partir de *Acremonium thermophilum* ALKO4245

Acremonium thermophilum ALKO4245 foi desenvolvida conforme descrito no Exemplo 1. O sobrenadante da cultura foi incubado a 70°C por 24 horas, após o que, foi concentrado por ultrafiltração. A xilanase pura foi obtida por purificação sequencial com interação hidrófoba e cromatografia de troca de cátion seguido por filtração com gel. A atividade da xilanase foi determinada empregando uma xilana de bétula como o substrato (procedimento do IUPAC 1987). A proteína foi ensaiada por Kit de Ensaio BioRad Protein (Bio-Rad Laboratories) empregando albumina de soro bovino, como padrão.

O sobrenadante concentrado da cultura foi aplicado a uma coluna de interação hidrófoba HiPrep 16/10 Butyl FF equilibrada com 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As proteínas ligadas foram avaliadas com gradiente linear a partir do tampão acima para fosfato de potássio 5mM, pH 6,0. A fração de proteína foi eluída em uma área de condutividade ampla de 120 a 15 mS/cm.

A amostra da coluna de interação hidrófoba foi aplicada a uma coluna de troca de cátion HiTrap SP XL equilibrada com 8 mM de acetato de sódio, pH 4,5. A proteína não se ligou a essa coluna, mas foi eluída no fluxo atravessante durante a alimentação da amostra. Esse eluído foi concentrado por ultrafiltração. A cromatografia hidrófoba foi repetida conforme descrito acima. As proteínas não ligadas foram coletadas e secas por congelamento.

A amostra dissolvida foi carregada em uma coluna de filtração de gel Superdex 75 HR10/30 equilibrada com 20 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 7,0, contendo 0,15 M NaCl. A proteína eluída da coluna com o volume de retenção de 11,2 mL foi julgada como sendo pura por SDS-eletroforese de gel de poliacrilamida. A massa molecular da proteína purifi-

cada foi avaliada com base no padrão da massa molecular (padrão SDS-PAGE pré-colorido, Faixa Ampla, Bio-Rad) como sendo de 60kDa. A atividade específica da proteína, denominada como At XYN-60, a 50°C foi determinada como sendo de 1.800 nkat/mg (procedimento do IU-PAC 1987, empregando xilana de bétula como o substrato). A atividade relativa foi aumentada em cerca de 1,2 vezes a 60°C e 1,65 vezes a 70°C (10 minutos, pH 5,0) quando comparada a 50°C. As atividades específicas contra MUG2 (4-metilumbeliferil-β-D-celobiosídeo), MUL (4-metilumbeliferil-β-D-lactosídeo) e MUG3 (4-metilumbeliferil-β-D-celotriosídeo) foram de 54, 33 e 78 nkat/mg (50°C, pH 5,0 10 minutos), respectivamente. Isso está de acordo com o fato de que a família de 10-xilanases também mostra atividade contra os aril glicopiranosídeos (Biely e outros, 1997).

Exemplo 10. Purificação de uma xilanase a partir de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Thermoascus aurantiacus ALKO4242 foi desenvolvida conforme descrito no Exemplo 1. A xilanase pura foi obtida por purificação seqüencial com interação hidrófoba, cromatografia de troca de ânion e cátion seguido por filtração com gel. A atividade da xilanase foi determinada empregando xilana de bétula como o substrato (procedimento do IUPAC 1987). A proteína foi ensaiada por kit de ensaio de Proteína de BioRad (Bio-Rad Laboratories) empregando albumina de soro bovino como padrão.

O sobrenadante da cultura foi aplicado a uma coluna de interação hidrófoba HiPrep 16/10 Phenyl Sepharose FF equilibrada com 20 mM de tampão de fosfato de potássio pH 6,0, contendo 0,7 M (NH₄)₂SO₄. As proteínas ligadas foram eluídas com um protocolo de eluição de duas etapas. A eluição foi realizada por queda da concentração de sal primeiro a 0,2 M (NH₄)₂SO₄ e após isso, foi fornecido um gradiente linear de 20 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 0,2 M (NH₄)₂SO₄ a 5 mM de fosfato de potássio, pH 6,0. A proteína foi eluída com 0,2 M (NH₄)₂SO₄ (I = 39 mS/cm).

A amostra foi dessalinizada em colunas 10DG (Bio-Rad) e aplicada a uma coluna de troca de ânion HiTrap DEAE FF equilibrada com 15 mM de Tris-HCl, pH 7,0. A proteína não se ligou à coluna de troca de ânion,

porém foi eluída no fluxo atravessante. A condutividade da amostra foi ajustada para corresponder àquela do acetato de sódio 20 mM, pH 4,5 por adição de água e o pH foi ajustado para 4,5 durante a concentração por ultrafiltração.

5 A amostra foi aplicada a uma coluna de troca de cátion HiTrap SP XL equilibrada com 20 mM de acetato de sódio, pH 4,5. As proteínas de ligação foram eluídas com gradiente linear a partir do tampão de equilíbrio para o mesmo tampão contendo 1M NaCl. A enzima foi eluída na área de condutividade de 1-7 mS/cm. A amostra foi liofilisada e após isso dissolvida
10 em água.

A amostra liofilisada foi dissolvida em água e aplicada a uma coluna de filtração de gel Superdex 75 HR 10/30 equilibrada com 20 mM de fosfato e sódio pH 7,0, contendo 0,15 M de NaCl. A proteína foi eluída da
15 coluna com um volume de retenção correspondendo a um peso molecular de 26 kDa. A proteína foi julgada como sendo pura por SDS-eletroforese de gel poliacrilamida. A massa molecular da proteína pura era de 30 kDa conforme avaliada com base no padrão de massa molecular (padrão SDS-PAGE pré-colorido, Faixa Ampla, Bio-Rad). O pI da proteína purificada, denominada como Ta XYN-30 foi determinado com PhastSystem (Pharmacia)
20 como sendo de cerca de 6,8. A atividade específica de TA XYN-30 a 50°C foi determinada como sendo de 4.800 nkat/mg (procedimento do IUPAC 1987, usando xilana de bétula como substrato).

Exemplo 11. Seqüenciamento interno do aminoácido

Os peptídeos internos foram seqüenciados por ionização de eletroaspersão combinada à espectrometria de massa em série (ESI-MS/MS)
25 empregando instrumento Q-TOF1 (Micromass). A proteína foi primeiro alquilada e digerida em peptídeos tripticos. Os peptídeos gerados foram dessalinizados e parcialmente separados por nanocromatografia de líquidos (fase reversa) antes da aplicação ao instrumento Q-TOF1. As seqüências de peptídeo
30 ínternas para celobioidrolases de *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum* são mostradas na Tabela 2. Os peptídeos da *Chaetomium* CBH foram obtidos após o gene *cbh* correspondente ser clonado. Os

peptídeos determinados de *Acromonium* CBH não foram utilizados na clonagem do gene correspondente.

Tabela 2. Sequências de peptídeo interno determinadas a partir de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 CBH (1-C-4-C) e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 CBH (1-A-4-A).

Peptídeo	Seqüência
Peptídeo 1_C	T P S T N D A N A G F G R
Peptídeo 2_C	V A F S N T D D F N R
Peptídeo 3_C	F S N T D D F N R K
Peptídeo 4_C	P G N S L/I T Q E Y C D A Q/K K
Peptídeo 1_A	V T Q F I/L T G
Peptídeo 2_A	M G D T S F Y G P G
Peptídeo 3_A	C D P D G C D F N
Peptídeo 4_A	S G N S L/I T T D F

I/L = leucina e isoleucina possuem a mesma massa molecular e não podem ser distinguidas na análise de ESI-MS/MS.

Q/K = a massa molecular de glutamina e lisina difere apenas em 0,036 ka e não pode ser distinguida na análise de ESI-MS/MS.

As seqüências de peptídeo interno da endoglucanase purificada, β -glicosidases e xilanasas de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 e *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 são listadas nas Tabelas 2, 4 e 5.

Tabela 3: Sequências de peptídeo interno determinadas a partir das endoglicanases de EG-40 de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, EG-54 de *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 e EG-28 de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Proteína	Peptídeo	Seqüência ^a
At EG_40	Peptídeo 1	Q S C S S F P A P L K P G C Q W R
	Peptídeo 2	Y A L T F N S G P V A G K
	Peptídeo 3	V Q C P S E L T S R
	Peptídeo 4	N Q P V F S C S A D W Q R
	Peptídeo 5	Y W D C C K P S C G W P G K

Proteína	Peptídeo	Seqüência ^a
	Peptídeo 6	P T F T
Ct EG_54	Peptídeo 1	E P E P E V T Y Y V
	Peptídeo 2	Y Y L L D Q T E Q Y
	Peptídeo 3	R Y C A C M D L W E A N S R
	Peptídeo 4	P G N T P E V H P Q/K
	Peptídeo 5	S I/L A P H P C N Q/K
	Peptídeo 6	Q Q Y E M F R
	Peptídeo 7	A L N D D F C R
	Peptídeo 8	W G N P P P R
Ta EG_28	Peptídeo 1	I/L T S A T Q W L R
	Peptídeo 2	G C A I/L S A T C V S S T I/L G Q E R
	Peptídeo 3	P F M M E R
	Peptídeo 4	Q Y A V V D P H N Y G R

(a I/L = leucina e isoleucina possuem a mesma massa molecular e não podem ser distinguidas na análise de ESI-MS/MS.

Q/K = a massa molecular de glutamina e lisina difere apenas em 0,036 ka e não pode ser distinguida na análise de ESI-MS/MS.

- 5 **Tabela 4:** Seqüências de peptídeo interno determinadas a partir das beta-glicosidases de β G-101 de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, β G-76 de *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 e β G-81 de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Proteína	Peptídeo	Seqüência ^a
At BG_101	Peptídeo 1	S P F T W G P T R
	Peptídeo 2	V V V G D D A G N P C
	Peptídeo 3	A F V S O L T L L E K
	Peptídeo 4	G T D V L/I Y T P N N K
	Peptídeo 5	Q P N P A G P N A C V L/I R
Ct BG_76	Peptídeo 1	E G L F I D Y R
	Peptídeo 2	P G Q S G T A T F R
	Peptídeo 3	E T M S S N V D D R
	Peptídeo 4	I A L V G S A A V V

Proteína	Peptídeo	Seqüência ^a
	Peptídeo 5	M W L C E N D R
	Peptídeo 6	Y P Q L C L Q D G P L G I R
	Peptídeo 7	E L N G Q N S G Y P S I
Ta BG_81	Peptídeo 1	T P F T W G K
	Peptídeo 2	L C L Q D S L P G V R
	Peptídeo 3	G V D V Q L G P V A G V A P R
	Peptídeo 4	V N L T L E
	Peptídeo 5	F T G V F G E D V V G
	Peptídeo 6	N D L P L T G Y E K

(a I/L = leucina e isoleucina possuem a mesma massa molecular e não podem ser distinguidas na análise de ESI-MS/MS.

Tabela 5: Seqüências de peptídeo interno determinadas a partir das xilanas de XYN-60 de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 e XYN-30 de

5 *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Proteína	Peptídeo	Seqüência
At XYN_60	Peptídeo 1	Y N D Y N L E Y N Q K
	Peptídeo 2	F G Q V T P E N
	Peptídeo 3	V D G D A T Y M S Y V N N K
	Peptídeo 4	K P A W T S V S S V L A A K
	Peptídeo 5	S Q G D I V P R A K
Ta XYN_30	Peptídeo 1	V Y F G V A T D Q N R
	Peptídeo 2	N A A I I Q A D F G Q V T P E N S M K
	Peptídeo 3	G H T L V W H S Q L P S W V S S I T D K
	Peptídeo 4	N H I T T L M T R
	Peptídeo 5	A W D V V N E A F N E D G S L R
	Peptídeo 6	L' Y I N D Y N L D S A S Y P K
	Peptídeo 7	A S T T P L L F D G N F N P K P A Y N A I V Q D L Q Q
	Peptídeo 8	Q T V F L N V I G E D Y I P I A F Q T A R

Exemplo 12. Construção de bibliotecas genômicas para *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum*

As bibliotecas genômicas de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 foram obtidas para vetor Lambda DASH^(R)II (Stratagene, USA) de acordo com as instruções do fornecedor. Os DNAs cromossômicos, isolados pelo método de Raeder e Broda (1985), foram parcialmente digeridos com *Sau3A*. Os DNAs digeridos foram fracionados por tamanhos e os fragmentos do tamanho escolhido (~5-23 kb) foram desfosforilados e ligados aos braços do vetor lambda digerido *Bam*HI.

As misturas de ligação foram embaladas usando extratos de embalagem Gigapack III Gold de acordo com as instruções do fabricante (Stratagene, USA). As titulações das bibliotecas genômicas de *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum* foram de $3,6 \times 10^6$ pfu/mL e $3,7 \times 10^5$ pfu/mL e aquelas das bibliotecas ampliadas foram de $6,5 \times 10^{10}$ pfu/mL e $4,2 \times 10^8$ pfu/mL, respectivamente.

O kit de vetor Lambda FIX^(R) II/Xho I Parcial Fill-in (Stratagene, USA) foi usado na construção das bibliotecas genômicas de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 e *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 de acordo com as instruções do fornecedor. Os DNAs cromossômicos, isolados pelo método de Raeder e Broda (1985), foram parcialmente digeridos com *Sau3A*. Os DNAs digeridos foram fracionados por tamanhos e os fragmentos do tamanho escolhido (~6-23 kb) foram enchidos e ligados aos braços do vetor Lambda FIX II digerido *Xho*I. As misturas de ligação foram embaladas usando extratos de embalagem Gigapack III Gold de acordo com as instruções do fabricante (Stratagene, USA). As titulações das bibliotecas genômicas de ALKO4242 e *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 foram de $0,2 \times 10^6$ e $0,3 \times 10^6$ pfu/mL e aquelas das bibliotecas ampliadas foram de $1,8 \times 10^9$ e $3,8 \times 10^9$ pfu/mL, respectivamente.

Exemplo 13. Clonagem dos genes de celobioidrolase (*cbh/cel7*) a partir de *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum*

Métodos de biologia molecular padrão foram empregados no

isolamento e tratamentos da enzima do DNA (plasmídeos, fragmentos de DNA), nas transformações do *E.coli*, etc. Os métodos básicos empregados são descritos nos livros de bolso de biologia molecular padrão, por exemplo, Sambrook e outros (1989) e Sambrook and Russell (2001).

5 As sondas para classificação de bibliotecas genômicas que foram construídas conforme descrito no Exemplo 12, foram ampliadas por PCR usando os DNAs genômicos de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 como gabaritos nas reações. Vários iniciadores testados nas reações de PCR foram designados de acordo com a sequência de nucleotídeo publicada (WO 03/000941, Hong e outros, 2003b). As misturas de reação da PCR continham 40 mM de Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Triton de X-100, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTPs, 5 μM de cada iniciador e 1 unidade de DNA polimerase Dynazyme EXT (Finnzymes, Finlândia) e 15 ~0,5-1 μg de DNA genômico. As condições para as reações da PCR foram as seguintes: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, tanto 1 minuto de recombinação a 62°C ($\pm 8^\circ\text{C}$ gradiente) para gabaritos de *Thermoascus* ALKO4242 e *Chaetomium* ALKO4265 ou 1 minuto de recombinação a 58°C ($\pm 6^\circ\text{C}$ gradiente) para gabarito de *Acremonium* ALKO4245, período de 2 minutos a 72°C e um período final de 10 minutos a 72°C.

Produtos de DNA de tamanhos esperados (calculados das sequências *cbh* publicadas) foram obtidos de todos os gabaritos genômicos usados. Os fragmentos de DNA de tamanhos esperados foram isolados das reações de PCR mais específicas e eles foram clonados para vetor pCR^(R) Blunt-TOPO^(R) (Invitrogen, USA). As inserções foram caracterizadas por sequenciamento e por realização de hibridizações Southern blot em relação aos DNAs genômicos digeridos com várias enzimas de restrição. Os fragmentos de pCR que foram escolhidos para serem empregados como sondas para classificação das bibliotecas genômicas de *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum* são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Iniciadores empregados nas reações de PCR e sondas escolhidas para classificação dos genes *cbh1cel7* a partir das bibliotecas genômicas de *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum*. São mostrados o DNA de gabarito genômico e as denominações dos plasmídeos contendo o fragmento de sonda.

Gene	Iniciador à frente	Iniciador reverso	DNA do gabarito	Fragmento (kb)	Plasmídeo
<i>Ta cbh</i>	TCEL11 atcccaactcccttccctcc	TCEL12 gaatttgcactatctccacg	<i>Thermoascus</i> ALKO4242	0,8 kb	pALK1633
<i>CT cbh</i>	TCEL7 cgatgcccaactggcgctggac	TCEL8 ttcttatctatctccacatc	<i>Chaetomium</i> ALKO4265	0,8 kb	pALK1632
<i>At cbh</i>	TCEL13 apctgcaccaactctctacacg	TCEL4 accgtgaactctctcctgtg	<i>Acremonium</i> ALKO4245	0,7 kb	pALK1634

As seqüências de aminoácido deduzidas de todas essas sondas tinham homologia com relação às várias seqüências CBH publicadas (programa BLAST, versão 2.2.9 no NCBI, National Center for Biotechnology Information; Altschul e outros, 1990) da família 7 da hidrolase de glicosídeo (Henrissat, 1991; Henrissat and Bairoch, 1993).

As inserções dos plasmídeos listados na Tabela 6 foram rotuladas com digoxigenina de acordo com as instruções do fabricante (Roche, Alemanha), e as bibliotecas genômicas ampliadas (placas de 2×10^5 - 3×10^5) foram classificadas com os fragmentos de sonda rotulados. A temperatura de hibridização para os filtros era de 68°C e os filtros foram lavados 2 x 5 minutos em temperatura ambiente usando 2 x SCC - 0,1% SDS seguido por 2 x 15 minutos a 68°C usando 0,1 x SSC - 0,1% SDS com as sondas homólogas empregadas. Várias placas positivas foram obtidas de cada uma das hibridizações. Na classificação das bibliotecas genômicas da *Acremonium* ALKO4245, algumas das placas positivas estavam hibridizando fortemente em relação à sonda em questão, porém, além disso, houve uma quantidade de placas hibridizando mais fracamente em relação às sondas. Isso sugeriu que outro(s) gene(s) da celobiohidrolase pode(m) estar presente(s) no genoma empregando reação cruzada. Cerca de quatro a cinco placas hibridizando fortemente foram purificadas a partir das classificações da biblioteca genômica de *Thermoascus* ALKO4242 e *Chaetomium* ALKO4265.

No caso de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, quatro das seis placas purificadas hibridizaram fracamente pela sonda empregada. Os DNAs do fago foram isolados e caracterizados por hibridizações Southern blot. Os fragmentos de restrição escolhidos hidridizando em relação à sonda foram subclonados no vetor pBluescript II KS+ e as regiões relevantes dos clones foram seqüenciadas.

No total, quatro genes *cbhlcel7* foram clonados; um de *Thermascus aurantiacus* ALKO4242, um de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e dois de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 (na fase anterior do trabalho, essas tinham os códigos At-cbh-C e At-cbh-A, e foram então denominadas como At ce/7A e At ce/7B, respectivamente). A tabela 7 resume as informações com relação às sondas usadas para classificação dos genes, os clones de fago dos quais os genes foram isolados, os fragmentos de restrição escolhidos contendo os genes de comprimento pleno com suas regiões promotora e terminadora, as denominações dos plasmídeos e os números de depósito para as cepas de *E.coli* transportando esses plasmídeos.

Tabela 7. Sondas empregadas para clonagem dos genes *cbhlcel7*, o clone de fago e os subclones escolhidos, o número dos plasmídeos e o número dos depósitos da cepa de *E.coli* correspondente

Gene	Sonda usada na classificação	Clone do fago	Fragmento subclonado em pBluescript II	Número do plasmídeo	Número do depósito de <i>E.coli</i>
Ta ce/7A	pALK1633	F12	3,2 kb <i>XbaI</i>	pALK1635	DSM 16723
Ct ce/7A	pALK1632	F36	2,3 kb <i>PvuI</i> – <i>HindIII</i>	pALK1642	DSM 16727
At ce/7B	pALK1634	F6	3,1 kb <i>EcoRI</i>	pALK1646	DSM 16728
At ce/7A	pALK1634	F2	3,4 kb <i>XhoI</i>	pALK1861	DSM 16729

As informações relevantes com relação aos genes e às seqüências de proteína deduzidas (SEQ ID Nº: 1-8) foram resumidos nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

As seqüências de peptídeo das proteínas CBH purificadas da *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e da *Acremonium thermophilum* ALKO4245 (Tabela 2) foram encontradas das seqüências de aminoácido dedu-

zidas dos clones contendo os genes *Ct cel7A* e *At cel7A*. Assim, seria concluído que foram clonados os genes codificando as proteínas CBH/Cel7 purificadas de *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum*.

Tabela 8. Resumo dos genes *cbh/cel7* isolados de *Thermoascus aurantiacus*

- 5 **ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245.**

Gene Cbh	Comprimento com íntrons (bp) ^(a)	Região de codificação (bp) ^(b)	Nº de íntrons	Comprimentos dos íntrons (pares de base)	Seq ID Nº:
<i>Ta Cel7A</i>	1439	1371	1	65	1
<i>Ct cel7A</i>	1663	1596	1	65	7
<i>At cel7B</i>	1722	1377	3	134, 122, 87	3
<i>At cel7A</i>	1853	1569	4	88, 53, 54, 86	5

(a) O códon STOP foi incluído.

(b) O códon STOP não foi incluído.

Tabela 9. Resumo das seqüências de aminoácido deduzidas das seqüências gênicas *cbh/cel7* de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALK4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245. ss, seqüência de sinal.

10

Proteína CBH	Nº de aas	Comprimento da seqüência de sinal NN/HMM ^(a)	CBD ^(b) de C-terminal	Peso molecular (MW) previsto (Da, (ss) não incluídas) ^(c)	pl previsto (seqüência de sinal não incluída)	sítios de N-glicosilação putativa	Seq. ID Nº:
<i>Ta Cel7A</i>	457	17/17	Não	46 873	4,44	2	2
<i>Ct Cel7A</i>	532	18/18	Sim, T497 a L532	54 564	5,05	3	8
<i>At Cel7B</i>	459	21/21	Não	47 073	4,83	2	4
<i>At Cel7A</i>	523	17/17	Sim, Q488 a L523	53 696	4,67	4	6

(a) A previsão com relação à seqüência de sinal foi feita empregando o programa SignalP V3.0 (Nielsen e outros, 1997; Bendtsen e outros, 2004); o

- 15 valor de NN foi obtido empregando redes neuronais e o valor HMM usando

modelos Markov impedidos.

(b O domínio de ligação de celulose (CBD), os aminoácidos da região CBD de C-terminal são indicados (M1 (Met #1) incluídos na numeração)

(c A sequência de sinal prevista não foi incluída. A previsão foi feita empregando a ferramenta pl/MW de computador em um servidor ExPASy (Gasteiger e outros, 2003).

(d O número de seqüências N-X-S/T.

As seqüências de aminoácido deduzidas de Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* e Cel7A de *Acremonium thermophilum* Cel7A (núcleo, sem CBD) eram mais homólogas uma com relação a outra (analisadas por alinhamento global Needleman-Wunsch, Needle EMBOSS 3.0.0, com Matriz EBLOSUM62, Penalidade de intervalo 10.0 e penalidade de extensão 0,5; Needleman and Wunsch, 1970). Além disso, Cel7A de *Acremonium thermophilum* deduzida tinha uma identidade inferior em relação à Cel7A de *Chaetomium thermophilum* deduzida. Cel7B de *Acremonium thermophilum* foi mais distinta das seqüências CBH/Cel7 da invenção.

A seqüência deduzida de *Chaetomium* Cel7U possuía as maiores identidades (analisada por alinhamento Needleman-Wunsch global, Needle EMBOSS, vide acima) com relação aos polipeptídeos de *Chaetomium thermophilum*, *Scytalidium thermophilum* e *Thielavia australiensis* CBHI descritas no WO 03/000941. De modo semelhante, a seqüência da *Thermoascus aurantiacus* Cel7A deduzida era altamente idêntica à CBHI publicada da *Thermoascus aurantiacus* (WO 03/000941, Hong e outros, 2003b). *Acremonium thermophilum* Cel7B possuía identidades significativamente inferiores às seqüências publicadas anteriormente, estando mais proximamente relacionada ao polipeptídeo CBHI da *Oryza sativa*. As maiores homologias da seqüência de Cel7A de *Acremonium thermophilum* foram com relação aos polinucleotídeos da CBHI da *Exidia glandulosa* e *Acremonium thermophilum* (WO 03/000941). O alinhamento indica que as seqüências clonadas de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 codificam as proteínas da CBH possuindo alta homologia com relação aos polipeptídeos da família 7

da glicosídeo hidrolase, portanto, essas foram designadas como Cel7A ou Cel7B (Henrissat e outros, 1998).

5 A comparação das seqüências de aminoácido deduzidas dos genes *cbh/cel7* a partir de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 Thielavia entre si mesmas e adicionalmente às seqüências encontradas nas bases de dados são mostradas na Tabela 10.

10 Tabela 10. Seqüências de homologia mais alta com relação à seqüências de aminoácido deduzidas dos genes *cbh/cel7* a partir de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245. O alinhamento foi realizado empregando alinhamento global Needleman-Wunsch (EMBLOSUM62, penalidade de intervalo 10,0, penalidade de extensão 0,5). * Indica uma seqüência de aminoácido derivada de um dos genes da celobioidrolase clonados nesse trabalho. 'Núcleo' indica alinhamento sem CBD.

15

Organismo, enzima e número de acesso	Identidade (%)
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> Cel7A	100,0
<i>Thermoascus aurantiacus</i> , AY840982	99,6
<i>Thermoascus aurantiacus</i> , AX657575	99,1
<i>Thermoascus aurantiacus</i> , AF421954	97,8
<i>Talaromyces emersonii</i> , AY081768	79,5
<i>Chaetomidium pingtungium</i> , AX657623	76,4
<i>Trichophaea saccata</i> , AX657607	73,4
* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7A (core)	70,6
<i>Emericella nidulans</i> , AF420020 (core)	70,4
* <i>Chaetomium thermophilum</i> Cel7A (core)	66,4

Organismo, enzima e número de acesso	Identidade (%)
* <i>Chaetomium thermophilum</i> Cel7A	100,0
<i>Chaetomium thermophilum</i> , AY861347	91,9
<i>Chaetomium thermophilum</i> , AX657571	91,7
<i>Scytalidium thermophilum</i> , AX657627	74,7
<i>Thielavia australiensis</i> , AX657577	74,6
<i>Acremonium thermophilum</i> , AX657569	72,3
<i>Exidia glandulosa</i> , AX657613	68,0
* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7A	66,9
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> Cel7A (core)	66,4
<i>Exidia glandulosa</i> , AX657615	60,8
<i>Chaetomium pingtungium</i> , AX657623	60,7
* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7B (core)	60,2
* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7B	100,0
<i>Oryza sativa</i> , AK108948	66,1
<i>Exidia glandulosa</i> , AX657615	65,0
<i>Acremonium thermophilum</i> , AX657569 (core)	64,8
<i>Thermoascus aurantiacus</i> , AX657575	64,8
* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7A	64,6
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> Cel7A	64,4
<i>Trichophaea saccata</i> , AX657607	63,6
* <i>Chaetomium thermophilum</i> Cel7A (core)	60,2
* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7A	100,0
<i>Exidia glandulosa</i> , AX657613	77,9
<i>Exidia glandulosa</i> , AX657615	77,9
<i>Acremonium thermophilum</i> , AX657569	77,5
<i>Thielavia australiensis</i> , AX657577	71,0
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> Cel7A (core)	70,6
<i>Scytalidium thermophilum</i> , AX657627	67,5
<i>Chaetomium thermophilum</i> , AX657571	67,5
<i>Chaetomium pingtungium</i> , AX657623	67,3
* <i>Chaetomium thermophilum</i> Cel7A	66,9
* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7B (core)	64,6

Exemplo 14. Produção de proteínas recombinantes de CBH/Cel7 *Trichoderma reesei*

Plasmídeos de expressão foram construídos para produção das proteínas CBH/Cel7 recombinantes a partir de *Thermoascus aurantiacus*

(Ta Cel7A), *Chaetomium thermophilum* (Ct Cel7A) e *Acremonium thermophilum* (At Cel7A, At Cel7B; na fase anterior do trabalho essas proteínas tinham os códigos temporários At CBH-C e At CBH-A, respectivamente). Os plasmídeos de expressão construídos são listados na Tabela 11. Os genes *cbh/cel7* recombinantes, incluindo suas próprias seqüências de sinal foram exatamente fundidos no promotor de *T. reesei cbh1* (cel7A) pela PCR. O término da transcrição foi garantido pelo terminador de *T. reesei cel7A* e o gene marcador *A. nidulans amdS* foi empregado para seleção dos transformantes conforme descrito em Paloheimo e outros. (2003). Os cassetes de expressão lineares (figura 2) foram isolados das estruturas do vetor após digestão com *EcoRI* e foram transformados em *T. reesei* A96 e A98 (ambas cepas tinham os genes codificando as quatro celulasas maiores C-BHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B e EGII/Cel5A deletada). As transformações foram realizadas como em Penttilä e outros (1987) com as modificações descritas em Karhunen e outros (1993), selecionando com acetamida como uma única fonte de nitrogênio. Os transformantes foram purificados nas placas de seleção através de conidia simples antes da esporulação dos mesmos em PD.

Tabela 11. Cassetes de expressão construídos para produzir proteínas de CBH/Cel7 de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 (Ta Cel7A), *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 (Ct Cel7A), e *Acremonium thermophilum* ALKO4245 (At Ce 17 A, At Cel7B) no *Trichoderma reesei*. A estrutura total dos cassetes de expressão era conforme descrito na figura 2. Os genes *cbh/cel7* clonados foram fundidos exatamente no promotor *T. reesei cbh1/cel7A*.

CBH/Cel7	Plasmídeo de expressão	Tamanho do cassete de expressão	Terminador de cel7A ^(b)
Ta Cel7A	pALK 1851	9,0 kb	245 bp (<i>XbaI</i>)
Ct Cel7A	pALK 1857	9,2 kb	240 bp (<i>HindIII</i>)
At Cel7B	pALK 1860	9,4 kb	361 bp (<i>EcoRI</i>)
At Cel7A	pALK 1865	9,5 kb	427 bp (<i>EcoRV</i>)

^(a) O cassete de expressão para transformação de *T. reesei* foi isolado da estrutura de vetor por emprego de digestão de *EcoRI*.

^b O número de nucleotídeos da região terminadora *cbh1/cel7A* genômica após o códon STOP. O sítio de restrição na extremidade 3' usado na excisão do fragmento gênico genômico é incluído entre parênteses.

A produção de CBH/Cel7 dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura dos cultivos do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes se desenvolveram por 7 dias a 28°C em um meio de indução de celulose à base de lactose complexo (Joutsjoki e outros, 1993) tamponado com 5% KH₂PO₄. A atividade da celobioidrolase foi ensaiada empregando substrato de 4-metilumbeliferil-β-D-lactosídeo (MUL) de acordo com van Tilbeurgh e outros, 1988. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados por emprego de Southern blots onde várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A expressão heteróloga das proteínas Ta Cel7A, Ct Cel7A, At Cel7A e At Cel7B foi analisada por SDS-PAGE com coloração Coomassive subsequente. A verificação de que nenhuma atividade de celobioidrolase ou produção de proteína heteróloga em SDS-PAGE seria detectada pelos transformantes de At Cel7B contendo cassete de expressão integrado, sugere que At Cel7B é produzida abaixo dos níveis de detecção no *Trichoderma* usando o projeto experimental descrito.

As preparações da enzima CBH/Cel7 recombinante foram caracterizadas em termos de pH ótimo e estabilidade térmica. O pH ótimo das proteínas CBH/Cel7 recombinantes de *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophilum* e *Acremonium thermophilum* foi determinado no tampão universal McIlvaine dentro de uma faixa de pH de 3,0-8,0 empregando 4-metilumbeliferil-β-D-lactosídeo (MUL) como um substrato (Fig 3A). O pH ótimo para as enzimas Ct Cel7A e At Cel7A é de 5,5, acima do que a atividade começa a cair gradualmente. O pH ótimo de Ta Cel7A bruta recombinante é de 5,0 (Figura 3A). A estabilidade térmica das enzimas Cel7 recombinantes foi determinada por medição da atividade de MUL no tampão universal McIlvaine no pH ótimo com tempo de reação de 1 hora. Conforme mostrado dos resultados Ta Cel7A e Ct Cel7A mantiveram mais de 60% de suas atividades a 70°C, considerando-se que At Cel7A mostrou ser claramente menos

estável em temperaturas maiores ($\geq 65^{\circ}\text{C}$) (figura 3B).

Os transformantes de CBH/Cel7 foram cultivados em bioreatores de laboratório a 28°C no meio indicado acima por 3-4 dias com controle do pH $4,4 \pm 0,1$ ($\text{NH}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$) para obter material para os testes de aplicação.

- 5 Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação e filtração através dos filtros Seitz-K 150 e EK (Pall SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemanha).

Exemplo 15. Produção das proteínas de fusão recombinantes Cel7A+CBD de *Thermoascus aurantiacus* em *T.reesei*

- 10 Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* (AF478686, Hong e outros, 2003b; SEQ ID Nº: 1) foi fundida ao ligante e CBD da CBHI/Cel7A do *Trichoderma reesei* (AR088330, Srisodsuk e outros, 1993) (= Tr CBD) seguido por produção da proteína de fusão (SEQ ID Nº: 28 correspondendo ao ácido nucleico da SEQ ID Nº: 27) na *T. reesei* conforme descrito em FI20055205/US
- 15 11/119,526; depositado em 29 de abril de 2005. Além disso, Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* foi fundida ao ligante e CBD de Cel7A de *Chaetomium thermophilum* (SEQ ID Nº:7) (Ct CBD). Para essa finalidade, a sequência de codificação do ligante e o CBD da Cel7A da *Chaetomium thermophilum* foram sintetizados por PCR empregando os iniciadores que se seguem:

- 20 5'-TTAAACATATGTTATCTACTCCAACATCAAGGTCGGACCCATCGGCTCGACCGTCCCTGGCCTTGAC-3'
(seqüência a frente) e
- 5'-TATATGCGGCCGCAAGCTTTACCATCAAGTTACTCCAGCAAATCAGGGAAGT-3'
(seqüência reversa).

- A mistura de reação da PCR continha tampão de reação 1 x
- 25 DyNAzyme® EXT (Finnzymes, Finlândia), 15 mM de Mg^{2+} , 0,2 mM de dNTPs, 2 μM de cada iniciador, 0,6 unidades de DNA polimerase DyNAzyme® EXT (Finnzymes, Finlândia), e aproximadamente 75 ng/30 μL de gabarito DNA, contendo gene de *cel7A* de comprimento pleno de *Chaetomium thermophilum*. As condições para a reação da PCR foram como se segue:
- 30 desnaturação inicial de dois minutos a 98°C , seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 98°C , recombinação por 30 segundos a 68°C (gradiente de $\pm 4^{\circ}\text{C}$), extensão de 30 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 minu-

tos. O fragmento de DNA específico na região da PCR foi obtido na faixa de temperatura de recombinação de 64°C a 68,5°C. O fragmento do CBD sintetizado de *Chaetomium thermophilum* foi ligado após o gene de *cel7A* de *Thermoascus aurantiacus* resultando em um ponto de junção de GPIGST entre os domínios. O fragmento ampliado da PCR no plasmídeo foi confirmado por seqüenciamento (SEQ ID Nº: 29). O gene *cel7A* de fusão construído foi exatamente fundido no promotor de *cbh1 (cel7A)* de *T. reesei*. A terminação da transcrição foi garantida por *cel7A* de *T. reesei* e o gene marcador de *A.nidulans amdS* foi usado para seleção dos transformantes como descrito em Paloheimo e outros. (2003).

O cassete de expressão linear foi isolado da estrutura do vetor após digestão de *NotI* e foi reformado nos protoplastos de *T.reesei* A96. As transformações foram realizadas como em Penttilä e outros (1987) com modificações descritas em Karhunen e outros (1993), selecionando com acetamida como uma fonte de nitrogênio única. Os transformantes foram purificados nas placas de seleção através de conidia simples antes da esporulação os mesmos em PD.

A produção de Cel7+CBD de *Thermoascus aurantiacus* (SEQ ID Nº: 28 e 30) dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura dos cultivos do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes se desenvolveram por 7 dias em um meio de indução de celulose à base de lactose complexo (Joutsjoki e outros, 1993) tamponado com 5% KH_2PO_4 e pH 5,5. A atividade da celobioidrolase foi ensaiada empregando substrato de 4-metilumbeliferil- β -D-lactosídeo (MUL) de acordo com van Tilbeurgh e outros, 1988. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados por emprego de Southern blots onde várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A análise SDS-PAGE mostrou que as enzimas Cel7A+CBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante foram produzidas como proteínas de fusão estáveis em *T.reesei*.

O transformante escolhido produzindo a proteína de fusão Ta Cel7A+Tr CBD (SEQ ID Nº: 28) foi também cultivado em bioreator de 2 litros

a 28°C no meio indicado acima por 3-4 dias com controle de pH de $4,4 \pm 0,2$ ($\text{NH}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$) para obtenção do material para os testes de aplicação. Os sobrenadantes foram recuperados por centrifugação e filtração através de filtros Seitz-K 150 e EK (Pall SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemanha).

Exemplo 16. Comparação das constantes de inibição de Michaelis-Menten e de inibição de celobiose das celobloïdrolases recombinantes purificadas

As constantes de inibição de Michaelis-Menten e de celobiose foram determinadas das celobloïdrolases produzidas heterologicamente em *T. reesei* (Exemplos 14 e 15). As enzimas foram purificadas conforme descrito no Exemplo 2. As concentrações de proteína das enzimas purificadas foram medidas por sua absorção em 280 nm usando um coeficiente de extinção molar teórico, que foi calculado das seqüências de aminoácido (Gill e von Hippel, 1989).

As constantes cinéticas (valores K_m e k_{cat}) e constante de inibição de celobiose (K_i) para Tr CBHI/Cel7A, Ta CBH/Cel7A, At CBH/Cel7A e Ct CBH/Cel7A, foram medidas empregando CNPLac (2-cloro-4-nitrofenil- β -D-lactosídeo) como o substrato em temperatura ambiente (22°C) em 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 5,7. Para determinação da constante de inibição (K_i), oito concentrações de substrato diferentes (31-4.000 μM) na presença de uma faixa de cinco concentrações de inibidor (0-100 μM ou 0-400 μM) que sustentavam o valor de K_i foram empregadas. Todos os experimentos foram realizados em placas de microtitulação e o volume de reação total foi de 200 μL . As taxas iniciais foram medidas, em cada caso, por monitoramento contínuo da liberação do ânion de cloro-nitrofenolato (CNP, 2-cloro-4-nitrofenolato) através de medições a 405 nm empregando leitor de placa de microtitulação Varioscan (Thermolabsystems). Os resultados foram calculados da curva padrão de CNP (de 0 a 100 μM). As concentrações de enzima usadas foram: Tr CBHI/Cel7A 2,46 μM , Ta CBH/Cel7A 1,58 μM , Ct CBH/Cel7A 0,79 μM e At CBH/Cel7A 3 μM . As constantes K_m e k_{cat} foram calculadas do ajuste da equação de Michaelis-Menten empregando o pro-

grama da Origin. Gráficos Lineweaver-Burk, regráficos (inclinação LWB versus [Glc2; celobiose]) e gráficos Hanes foram empregados para distinguir entre inibição competitiva e do tipo mista e para determinar as constantes de inibição (K_i).

- 5 Os resultados das medições de cinética são mostrados na Tabela 12 e Tabela 13. Conforme pode ser visto, Ct CBH/Cel7A possui claramente o número de rotações maior (k_{cat}) e CNPLac e também a constante de especificidade (k_{cat}/K_m) é maior se comparada à CBHI/Cel7A de *T.reesei*. A celobiose (Glc2) é um inibidor competitivo para todas as celulasas medidas e a Tr CBHI/Cel7A (usada como um controle) possui a inibição mais forte (isto é, o valor K_i mais baixo) por celobiose. A At CBH/Cel7A possui constante de inibição superior a sete vezes em comparação àquela da Tr CBHI/Cel7A. Esses resultados indicam que todas as três celobioidrolases poderiam trabalhar melhor em hidrólise de celulose devido à inibição diminuída da celobiose quando comparada a celobioidrolase I de Cel7A da *Trichoderma reesei*.

Tabela 12. Comparação das constantes de inibição da celobiose de quatro GH celobioidrolases da família 7, medida em 50 mM de CNPLac em tampão fosfato de sódio, pH 5,7 a 22°C.

Enzima	K_i (μ M)	Tipo de inibição
Ct Cel7A	39	competitiva
Ta Cel7A	107	competitiva
At Cel7A	141	competitiva
Tr Cel7A	19	competitiva

- Tabela 13.** Comparação das constantes cinéticas de Michaelis-Menten de Cel7A de celobioidrolase da *Chaetomium thermophilum* para CBHI/Cel7A de *T. reesei* medida em CNPLac em 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 5,7, a 22°C.

Enzima	K_{cat} (min^{-1})	K_m (μ M)	K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Ct Cel7A	18,8	1960	9,5 103
Tr Cel7A	2,6	520	5,0 103

Exemplo 17. Hidrólise de celulose cristalina (Avicel) por celobioidrolases recombinantes

As celobioidrolases recombinantes purificadas Ct Cel7A, Ta Cel7A, Ta Cel7A+Tr CBD, Ta Cel7A+ Ct CBD, At Cel7A bem como a versão de núcleo da Ct Cel7A (vide a seguir) foram testadas em quantidades equimolares em hidrólise de celulose cristalina em duas temperaturas, 45°C e 70°C; Tr Cel7A de *T. reesei* purificada e sua versão de núcleo (vide abaixo) foram usadas como uma comparação. Os ensaios de hidrólise da celulose cristalina (Ph 101, Avicel; Fluka, Bucsh, Suíça) foram realizados em uma escala de tubo de 1,5 mL, 50 mM de acetato de sódio, pH 5,50. Avicel foi agitado a 45°C ou a 70°C com a solução da enzima (1,4 µM) e o volume final da mistura de reação era de 325 µL. A hidrólise foi seguida até 24 horas retirando amostras em seis pontos de tempo diferentes e parando a reação por adição de 163 µL de reagente de parada contendo 9 vol de etanol a 94% e 1 vol de 1M glicina (pH 11). A solução foi filtrada através de uma unidade de filtração Millex GV13 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA). A formação de açúcares de redução solúveis no sobrenadante foi determinada por método para-hidroxibenzóico-hidrazida ácida (PAHBAH) (Lever, 1972) empregando uma curva padrão de celobiose (50 a 1.600 µM de celobiose). Uma solução de 0,1 M PAHBAH fabricado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em 0,5 M NaOH (100 µL) foi adicionada a 150 µL da amostra filtrada e fervida por 10 minutos, após o que a solução foi resfriada em gelo. A absorção das amostras a 405 nm foi medida.

As versões de núcleo das celobioidrolases abrigando um CBD em sua forma nativa foram obtidas como se segue: Ct Cel7A e Tr Cel7A foram expostas à digestão proteolítica para remover o domínio de ligação de celulose. A digestão da papaína (Papaya Latex, 14 U/mg, Sigma) pelas celobioidrolases nativas foi realizada a 37°C por 24 horas em uma mistura de reação composta de 10 mM de L-cisteína e 2 mM de EDTA em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 5,0) com adição de papaína (duas concentrações de papaína foram testadas: de um quinto a um décimo da quantidade de papaína da quantidade total da Cel7A na mistura de reação). A proteína

de núcleo resultante foi purificada com Coluna de troca de ânion DEAE Sepharose FF (Pharmacia, Uppsala, Suécia) conforme descrito acima. O produto foi analisado em SDS-PAGE.

Os resultados da hidrólise a 45°C e 70°C são mostrados na figura 4 e figura 5, respectivamente. Os resultados mostram claramente que todas as celobioidrolases mostram hidrólise mais rápida e completa em ambas temperaturas, quando comparadas a celobioidrolase da técnica anterior de Cel7A da *T. reesei*. As celobioidrolases termoestáveis de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 e *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 a 70°C são superiores quando comparadas à Cel7A de *T. reesei*, também no caso onde o núcleo de Cel7A da *Thermoascus* é ligado ao CBD da Cel7A da *T. reesei* (Ta Cel7A + Tr CBD). Foi surpreendente o fato de que as celobioidrolases isoladas e clonadas nesse trabalho serem superiores, quando abrigando um CBD, na taxa e formação de produto na hidrólise de celulose cristalina também na temperatura de hidrólise convencional de 45°C, quando comparada a celobioidrolases da técnica anterior de Cel7A da *T. reesei* (CBHI) na mesma concentração de enzima. Os resultados também estão de acordo com aquelas preparações de enzima (At Cel7A e ct Cel7A), que foram purificadas dos hospedeiros originais e testadas na hidrólise de Avicel (50°C, 24 horas) (Exemplo 2, Tabela 1).

Exemplo 18. Clonagem dos genes de endoglicanase da *Acremonium thermophilum* ALKO4245, *Chaetomium thermophilum* ALKO4261, e *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Métodos de biologia molecular padrão foram empregados conforme descrito no Exemplo 13. A construção das bibliotecas genômicas de *Acremonium*, *Chaetomium*, e *Thermoascus* foi descrita no Exemplo 12.

Os peptídeos derivados das endoglucanases purificadas de *Acremonium* e *Chaetomium* compartilharam homologia com várias endoglicanases da glicosil hidrolase família 45, tal como endoglicanase de Cel45A de *Melanocarpus albomyces* (AJ515703) e endoglicanase de *Humicola insolens* (A35275), respectivamente. Os peptídeos derivados da endoglicanase de *Thermoascus* compartilharam quase 100% de identidade com a sequência

de endoglicanase publicada de EG1 de *Thermoascus aurantiacus* (AF487830). De modo a ampliar a sonda para classificação das bibliotecas genômicas de *Acremonium* e *Chaetomium*, iniciadores de degeneração foram designados com base nas seqüências de peptídeo. A ordem dos peptídeos na seqüência da proteína e a natureza de sentido ou anti-sentido correspondente dos iniciadores foi deduzida da comparação com endoglicanases homólogas publicadas. As seqüências de iniciador e os peptídeos correspondentes são listados na Tabela 14. Devido à identidade de quase 100% dos peptídeos de *Thermoascus* com a seqüência publicada, o gene da endoglicanase foi ampliado por PCR diretamente do DNA genômico.

Tabela 14. Oligonucleotídeos sintetizados e usados como iniciadores da PCR para ampliar a sonda para classificação do gene de cel45A (EG-40) de *Acremonium thermophilum* e cel7B (EG-54) de *Chaetomium thermophilum* a partir das bibliotecas genômicas correspondentes

Proteína	Peptídeo	Localização do iniciador	Seqüência do iniciador ^(b)
At EG_40	Peptídeo 5	1-6	TAYTGGGAYTGYTGAAARCC
	WFQNADN ^(c)		RTTRTCNGCRTTYTGRAACCA
Ct EG_54	Peptídeo 7	3-7	GCAAGCTTCGRCARAARTCRTCRTT ^(d)
	Peptídeo 2	5-9	GGAATTCGAYCARACNGARCARTA ^(e)

^(a) Aminoácidos do peptídeo usado para designação da seqüência do iniciador

^(b) N = A, C, G, ou T; R = A ou G; Y = C ou T

^(c) Peptídeo não derivado da proteína EG-40 de *Acremonium*, porém se origina da seqüência de Cel45A de *M. albomyces* (AJ515703) homóloga à EG-40.

^(d) Um sítio de restrição *HindIII* foi adicionado à extremidade 5' do oligonucleotídeo

^(e) Um sítio de restrição *EcoRI* foi adicionado à extremidade 5' do oligonucleotídeo.

A sonda específica do gene de cel45A de *Acremonium thermophilum* para classificação da biblioteca genômica foi ampliada com os inicia-

dores à frente (TAYTGGGAYTGYTGYAARCC) e reversos (RTTRTCNG-CRTTYTGRAACCA) usando DNA genômico como um gabarito. As misturas de reação da PCR continham 50 mM de Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de dNTPs, 0,5 μg de cada iniciador, 1 unidade de DNA polimerase Dynazyme (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 0,5 μg de DNA genômico de *Acremonium*. As condições para reações da PCR foram como se segue: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto de recombinação a 50-60°C, 2 minutos de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para ampliação do gene de *cel7B* de *Chaetomium thermophilum* (codificação para Ct EG-54) sonda específica, um iniciador à frente (GGAATTCGAYCARACNGARCARTA) e um iniciador reverso (GCA-AGCTTCGRCARAARTCRTCRTT) foram usados. As misturas de reação da PCR continham 10 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTPs, 250 pmol de cada iniciador, 2 unidades de DNA polimerase Dynazyme II (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 2 μg de DNA genômico de *Chaetomium*. As condições para reação da PCR eram conforme descrito acima, exceto que a recombinação foi realizada a 45-50°C.

Dois produtos da PCR foram obtidos da reação da PRC de *Acremonium*. Fragmentos de DNA de cerca de 0,6 kb e 0,8 kb foram isolados do gel agarose e foram clonados no vetor pCR4-TOPO® TA (Invitrogen, USA) resultando nos plasmídeos pALK1710 e pALK1711, respectivamente. Os produtos de DNA foram caracterizados por seqüenciamento e realização de hibridizações Southern blot para o DNA genômico de *Acremonium* digerido com várias enzimas de restrição. O padrão de hibridização obtido com os dois fragmentos em condições de lavagem estridente sugerem que dois genes de endoglicanase putativa seriam classificados da biblioteca genômica de *Acremonium*. As seqüências de aminoácido deduzidas de ambos produtos da PCR tinham homologia com relação às várias seqüências de endoglicanase publicadas da glicosil hidrolase família 45 (programa BLAST, National Center for Biotechnology Information; Altschul e outros, 1990).

Um produto da PCR de tamanho esperado (estimado da sequência de endoglicanase homóloga *Humicola insolens*, A35275) foi obtida da reação da PCR de *Chaetomium*. Esse fragmento de DNA de cerca de 0,7 kb foi clonado no vetor pCR4-TOPO^(R) TA (Invitrogen, USA) resultando no plasmídeo pALK2005 e analisado conforme descrito acima. A sequência de aminoácido deduzida do produto da PCR tinha homologia com relação a todas as sequências de celulase publicadas da glicosil hidrolase família 7 (programa BLAST, versão 2.2.9 na NCBI, National Center for Biotechnology Information; Altschul e outros, 1990).

10 A inserção dos plasmídeos pALK1710, pALK1711 e pALK2005 foi isolada pela digestão da enzima de restrição e rotulada com digoxigenina de acordo com as instruções do fabricante (Roche, Alemanha). Cerca de $1-2 \times 10^5$ placas da biblioteca genômica ampliada de *Acremonium* ou *Chaetomium* foram classificadas. A temperatura para hibridização era de 68°C e os
15 filtros foram lavados 2 x 5 minutos em temperatura ambiente usando 2 x SSC - 0,1% SDS seguido por 2 x 15 minutos a 68°C usando 0,1 SSC - 0,1% SDS. Várias placas positivas foram obtidas, das quais cinco a seis placas hibridizando fortemente foram purificadas de cada classificação. DNAs do fago foram isolados e analisados por hibridização Southern blot. Fragmentos
20 de restrição hibridizando com relação à sonda foram subclonados no vetor pBluescript II KS+ (Stratagene, USA) e as partes revelantes foram sequenciadas. Em todos os casos, o fragmento de fago subclonado contém o gene de comprimento pleno de interesse. A tabela 15 resume as informações das sondas usadas para classificação dos genes de endoglicanase, clones de
25 fago a partir dos quais os genes foram isolados, fragmentos de restrição escolhidos contendo os genes de comprimento pleno com suas regiões promotora e terminadora, nomes dos plasmídeos contendo o fragmento de fago subclonado e os números de depósito na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Culture Collection (DSM) para as cepas de
30 *E.coli* transportando esses plasmídeos.

Tabela 15. Sondas usadas para clonagem do gene da endoglicanase, clones de fago e subclone escolhidos, nome do plasmídeo e número de depósito correspondente da cepa *E.coli*.

Gene	Biblioteca genômica	Sonda usada na classificação	Clone do fago	Fragmento subclonado	Plasmídeo	Nº de depósito de <i>E.coli</i>
At <i>ce45A</i>	<i>A. thermophilum</i> ALKO4245	pALK1710	P24	5,5 kb <i>SmaI</i>	pALK1908	DSM 17324
At <i>ce45B</i>	<i>A. thermophilum</i> ALKO4245	pALK1711	P41	6,0 kb <i>XhoI</i>	pALK1904	DSM 17323
Ct <i>ce7B</i>	<i>C. thermophilum</i> ALKO4281	pALK2005	P55	5,1 kb <i>BamHI</i>	pALK2010	DSM 17729

O gene *ce5A* de *Thermoascus aurantiacus* (codificando para EG-28) (SEQ ID Nº:9) foi ampliado diretamente do DNA genômico isolado por reação da PCR. Os iniciadores à frente (ATTAACCGCGGACTGCGCATCATGAAGCTCGGCTCTCTCGTGCTC) e reverso (AACTGAGGCATAGAAACTGACGTCATATT) que foram usados para ampliação foram designados com base no gene *eg1* de *T. aurantiacus* publicado (AF487830). As misturas da PCR continham tampão 1 x Phusion HF, 0,3 mM dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador, duas unidades de DNA polimerase Phusion® DNA (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 0,25 µg de DNA genômico de *Thermoascus*. As condições para reações da PCR foram como se segue: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos de recombinação a 57-67°C, 2 minutos e meio de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto ampliado de 1,3 kb contendo o gene exato (do códon START para STOP) foi clonado como um fragmento *SacII-PstI* no vetor p-Bluescript II KS+. Dois clones independentes foram seqüenciados e um clone foi selecionado e designado como pALK1926. O número de depósito da cepa *E.coli* contendo pALK1926 na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Culture Collection é DSM 17326.

Informações relevantes dos genes e seqüências de proteína de-

- duzidas (SEQ ID N°:9-16) são resumidas nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. As seqüências de peptídeo das endoglicanases purificadas de EG-40 de *Acremonium* (gene At cel45A), EG-54 de *Chaetomium* (gene Ct cel7B) e EG-28 de *Thermoascus* (gene Ta cel5A) foram encontradas nas seqüências de aminoácido deduzidas correspondentes dos genes clonados confirmando que os genes apropriados foram clonados.

Tabela 16. Resumo dos genes de endoglicanase isolados de *Acremonium thermophilum*, *Chaetomium thermophilum* e *Thermoascus aurantiacus*.

Gene da endoglicanase	Comprimento com introns (bp) ^(a)	Região de codificação (bp) ^(b)	Nº de introns	Comprimentos dos introns (pares de base)	Seq ID N°:
Ta Cel45A	1076	891	2	59, 123	11
Ct cel45B	1013	753	2	155, 102	13
At cel7B	1278	1275	-	-	15
At cel5A	1317	1005	5	55, 60, 59, 74, 61	9

(a) O códon STOP está incluído

- 10 (b) O códon STOP não está incluído

Tabela 17. Resumo das seqüências de endoglicanase deduzidas de *Acremonium thermophilum*, *Chaetomium thermophilum* e *Thermoascus aurantiacus*. ss, seqüência de sinal.

Proteína da endoglicanase	Nº de aas	Comprimento de ss NN/HMM ^(a)	CBD ^(b)	Peso molecular (MW) previsto (Da, ss, não incluídas) ^(c)	pl previsto (ss não incluída)	sítios de N-glicosilação putativa	Seqüência ID N°:
AtEG_40	297	21/21	Sim, K265 a L297	28625	4,79	2	12
semelhante a EG_40	251	20/20	Não	23972	6,11	2	14
Ct EG_54	425	17/17	Não	45358	5,44	1	16
Ta EG+28	335	30 ^(e)	Não	33712	4,30	1	10

^(a) A previsão da sequência de sinal foi realizada usando o programa SignalP V3.0 (Nielsen e outros, 1997; Bendtsen e outros, 2004); o valor NN foi obtido usando redes neurais e valor HMM usando modelos Markov impedidos.

^(b) São indicadas as presenças de um domínio de ligação de celulose na proteína, os aminoácidos de CBD C-terminal são indicados (numeração de acordo com o polipeptídeo de comprimento pleno)

^(c) A sequência de sinal prevista não está incluída. A previsão foi feita usando a ferramenta Compute pI/MW no servidor ExPASy (Gasteiger e outros, 2003).

10 ^(d) Os sítios de N-glicosilação putativa N-X-S/T foram previstos usando o programa NetNGlyc 1.0 (Gupta e outros, 2004).

^(e) De acordo com Hong e outros, 2003a

As seqüências de proteína deduzidas das endoglicanases de EG-40 (At Cel45A) de *Acremonium* e semelhante a EG-40 (At Cel45B), EG-15 54 (Ct Cel7B) *Chaetomium* e EG-28 (Ta Cel5A) *Thermoascus* compartilham homologia com as celulasas da glicosil hidrolase família 45 (*Acremonium*), família 7 (*Chaetomium*), e família 5 (*Thermoascus*), assim identificando os genes isolados como elementos dessas famílias de genes. As homologias mais próximas das endoglicanases EG-40/Cel45A de *Acremonium* e semelhante a EG-40/Cel45B são as endoglicanases de *Thielavia terrestris* (CQ827970, 77,3% de identidade) e *Myceliophthora thermophila* (AR094305, 66,9% de identidade), respectivamente (Tabela 18). As duas endoglicanases isoladas de *Acremonium* família 45 compartilham apenas uma identidade de 53,7% uma com a outra. Dessas enzimas, apenas a EG-40/Cel45A contém 20 um domínio de ligação de celulose (CBD).

A homologia mais próxima para a sequência da proteína prevista da endoglicanase de EG-54/Cel7B de *Chaetomium* endoglicanase é encontrada na sequência de celulase da Cel7A de *Melanocarpus albomyces* (AJ515704). A identidade entre essas duas seqüências de proteína é de 30 70,6%.

A seqüência de proteína da endoglicanase isolada de *Thermoascus aurantiacus* é completamente idêntica àquela EGI de *T.aurantiacus*

publicada (AF487830, Tabela 18). A homologia mais próxima foi encontrada em uma sequência de β -glicanase de *Talaromyces emersonii* (AX254752, 71,1% de identidade).

- 5 **Tabela 18.** Comparação das endoglicanases deduzidas de EG-40 de *Acremonium thermophilum*, semelhante a EG-40/Cel45B, EG-54/Cel7B de *Chaetomium thermophilum* e EG-28/Cel5A de *Thermoascus aurantiacus* com suas contrapartes homólogas. O alinhamento foi realizado usando o programa Needle do pacote de programas da EMBOSS. *Indica uma endoglicanase codificada por um gene clonado nesse trabalho.

Organismo, enzima e número de acesso	Identidade (%)
<i>Acremonium thermophilum</i> EG_40	100,0
<i>Thielavia terrestris</i> EG45, CQ827970	77,3
<i>Melanocarpus albomyces</i> Cel45A, AJ515703	75,3
<i>Neurospora crassa</i> , hypothetical XM_324477	68,9
<i>Humicola grisea</i> var <i>thermolea</i> , EGL3, AB003107	67,5
<i>Humicola insolens</i> EG5, A23635	67,3
<i>Myceliophthora thermophila</i> fam 45, AR094305	57,9
* <i>Acremonium thermophilum</i> EG_40_like	53,7
<i>Acremonium thermophilum</i> EG_40_like	100,0
<i>Myceliophthora thermophila</i> fam 45, AR094305	66,9
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15 hypothetical, XM_363402	61,9
<i>Thielavia terrestris</i> EG45, CQ827970	
* <i>Acremonium thermophilum</i> EG_40	56,8
<i>Melanocarpus albomyces</i> Cel45A, AJ515703	53,7
	52,8
<i>Chaetomium thermophilum</i> EG_54	100,0
<i>Melanocarpus albomyces</i> Cel7A, AJ515704	70,6
<i>Humicola grisea</i> var <i>thermolea</i> EGI, D63516	68,8
<i>Humicola insolens</i> EGI, AR012244	67,7
<i>Myceliophthora thermophila</i> EGI, AR071934	61,7
<i>Fusarium oxysporum</i> var <i>lycopercisi</i> EGI, AF29210	53,5
<i>Fusarium oxysporum</i> EGI, AR012243	52,6

Organismo, enzima e número de acesso	Identidade (%)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> EG_28	100,0
<i>Thermoascus aurantiacus</i> EG, AX812161	100,0
<i>Thermoascus aurantiacus</i> EGI, AY055121	99,4
<i>Talaromyces emersonii</i> β -glucanase, AX254752	71,1
<i>Talaromyces emersonii</i> EG, AF440003	70,4
<i>Aspergillus niger</i> EG, A69663	70,1
<i>Aspergillus niger</i> EG, A62441	69,9
<i>Aspergillus niger</i> EG, AF331518	69,6
<i>Aspergillus aculeatus</i> EGV, AF054512	68,5

Exemplo 19. Produção de endoglicanase recombinante em *Trichoderma reesei*

Os plasmídeos de expressão foram construídos para produção de proteínas recombinantes de EG-40/Cel45A de *Acremonium*, semelhante a EG-40/Cel45B, e EG-28/Cel5A de *Thermoascus* conforme descrito no Exemplo 14. Cassetes de expressão linear (tabela 19) foram isolados da estrutura do vetor por digestão da enzima de restrição, transformada em *T. reesei* A96 e transformantes purificados conforme descrito no Exemplo 14.

Tabela 19. Cassetes de expressão construídos para produção de endoglicanases de EG-40/Cel45A de *Acremonium thermophilum*, semelhante a EG-40/Cel45B e EG-28/Cel5A de *Thermoascus aurantiacus* no *Trichoderma reesei*.

A estrutura esquemática dos cassetes de expressão é descrita na figura 2.

Endoglicanase	Plasmídeo de expressão	Tamanho do cassete de expressão	Terminador heterólogo
At EG_40	pALK1920	10,9 kb <i>NotI</i>	156 bp (<i>HindIII</i>)
At EG_40_like	pALK1921	8,6 kb <i>EcoRI</i>	282 bp (<i>SspI</i>)
Ta EG_28	pALK1930	8,6 kb <i>NotI</i>	nenhum

^(a) O cassete de expressão para transformação de *T. reesei* foi isolado da estrutura de vetor por digestão com *EcoRI* ou *NotI*.

^(b) É indicado o número de nucleotídeos após o códon STOP do gene clonado que são incluídos no cassete de expressão. O sítio de restrição na região 3' do gene que foi usado na construção do cassete de expressão é indicado entre parênteses.

A produção da endoglicanase dos transformantes foi analisada dos sobrenadantes de cultura dos cultivos de frascos de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram como no Exemplo 14 e a atividade da enzima da proteína recombinante foi medida a partir do sobrenadante de cultura como a liberação dos açúcares de redução a partir da carboximetilcelulose (2% (peso/volume) CMC) a 50°C em 50 mM de tampão citrato, pH 4,8 essencialmente conforme descrito por Bailey and Nevalainen 1981; Haakana e outros, 2004. A produção das proteínas recombinantes foi também detectada a partir dos sobrenadantes de cultura por SDS-eletroforese de gel poliacrilamida. Os anticorpos policlonais específicos para *Acremonium* EG-40 foram produzidos em coelhos (University of Helsinki, Finlândia). A expressão de EG-40 foi verificada por análise Western blot com anticorpos anti-EG-40 usando o ProtoBlot Western blot AP (Promega). Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por Southern blotting empregando o cassete de expressão como uma sonda.

O pH ótimo das endoglicanases produzidas heterologicamente foi determinado no tampão universal de McIlvaine dentro de uma faixa de pH de 4,0-8,0 usando carboximetilcelulose como substrato. Conforme mostrado na figura 6A, a faixa mais ampla de pH (4,5-6,0) é aquela da proteína EG-40/Cel45A de *Acremonium*, o pH ótimo sendo de 5,5. Os pHs ótimos para as outras endoglicanases produzidas heterologicamente são de 5,0-5,5 e 6,0 para semelhante a EG-40/Cel45B de *Acremonium* e EG-28/Cel5A de *Thermoascus*, respectivamente. A temperatura ótima para atividade enzimática dessas endoglicanases foi determinada na faixa de temperatura de 50-85°C conforme descrito acima. A atividade mais alta das enzimas foi determinada como sendo a 75°C, 60°C e 75°C para EG-40/Cel45A de *Acremonium*, semelhante a EG-40/Cel45B e EG-28/Cel5A de *Thermoascus*, respectivamente (Figura 6 B).

Os transformantes escolhidos foram cultivados, conforme descrito no Exemplo 14, em um bioreator de 2 litros por quatro dias (28°C, pH 4,2) para obter material para os testes de aplicação.

Exemplo 20. Clonagem dos genes de beta-glicosidase de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 e *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Métodos de biologia molecular padrão foram empregados conforme descrito no Exemplo 13. A construção das bibliotecas genômicas de *Acremonium*, *Chaetomium* e *Thermoascus* foi descrita no Exemplo 12.

Os peptídeos derivados das β -glicosidases purificadas de *Acremonium*, *Chaetomium* e *Thermoascus* compartilharam homologia com várias β -glicosidases da glicosil hidrolase família 3, tais como β -glicosidases de *Acremonium cellulolyticus* (BD168028), *Trichoderma viride* (AY368687) e *Talaromyces emersonii* (AY072918) respectivamente. De modo a ampliar a sonda para classificação das bibliotecas genômicas de *Acremonium*, *Chaetomium* ou *Thermoascus* iniciadores de degeneração foram designados com base nas seqüências de peptídeo. A ordem dos peptídeos na seqüência da proteína e a natureza de sentido ou anti-sentido correspondente dos iniciadores foi deduzida da comparação com β -glucosidases. As seqüências de iniciador e os peptídeos correspondentes são listados na Tabela 20.

Tabela 20. Oligonucleotídeos sintetizados e usados como iniciadores da PCR para ampliar uma sonda para classificação do gene de cel3A (β G-101) de *Acremonium thermophilum*, cel3A (β G-76) de *Chaetomium thermophilum* e cel3A (β G-81) de *Thermoascus aurantiacus* a partir das bibliotecas genômicas correspondentes

Proteína	Peptídeo	Localização do iniciador ^(a)	Seqüência do iniciador ^(b)
At β G_101	EKVNL ^(c)		GARAARGTNAAYCTNAC
	Peptídeo 4	6-11	YTTRCCRTTTRTTSGGRGTRTA
Ct β G_76	Peptídeo 6	4-9	TNTGYCTNCARGAYGG
	Peptídeo 1	3-8	TCRAARTGSCGRTARTCRATRAASAG
Ta β G_81	Peptídeo 3	1-5	AARGGYGTSGAYGTSCAR
	Peptídeo 1	2-7	YTTRCCCCASGTRAASGG

^(a) Aminoácidos do peptídeo usados para designação da seqüência do iniciador

^(b) Para reduzir a degeneração, alguns códons foram escolhidos de acordo com a preferência dos fungos. N = A, C, G, ou T; R = A ou G; Y = C ou T

^(c) Peptídeo não derivado da proteína purificada β G-101 de *Acremonium*, porém se origina da sequência de β -glicosidase *A. cellulolyticus* (BD168028)

5 homóloga à β G-101.

As sondas para classificação das bibliotecas genômicas construídas foram ampliadas com as combinações de iniciador listadas (Tabela 20) usando DNA genômico de *Acremonium*, *Chaetomium* ou *Thermoascus* como o gabarito. As misturas de reação da PCR continham 50 mM de Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de dNTPs, 0,25 μg de cada iniciador, 1 unidade de DNA polimerase Dynazyme (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 0,5 μg de DNA genômico. As condições para reações da PCR foram como se segue: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto de recombinação a 40°C (DNA de *Acremonium* como um gabarito), a 50°C (DNA de *Chaetomium* como um gabarito) ou 63°C (DNA de *Thermoascus* como um gabarito), 2-3 minutos de extensão a 72°C por 5-10 minutos.

Produtos da PCR específicos de tamanho esperado (estimado das sequências de β -glicosidase homólogas BD168028, AY072918 e AY368687) foram isolados do gel de agarose. Fragmentos de DNA de cerca de 1,8 kb (*Acremonium*), 1,5 kb (*Chaetomium*) e 1,52 kb (*Thermoascus*) foram clonados

no vetor pCR4-TOPO^(R) TA (Invitrogen, USA) resultando nos plasmídeos pALK1924, pALK1935 e pALK1713, respectivamente. Os produtos de DNA foram caracterizados por sequenciamento e realização de hibridizações Southern blot em relação ao DNA genômico digerido com várias enzimas de restrição. O padrão de hibridização nas condições de lavagem estridentes sugerem que um gene de β -glicosidase putativo seria isolado da biblioteca genômica de *Acremonium*, *Chaetomium* e *Thermoascus*. As sequências de aminoácido deduzidas de todos os três produtos da PCR possuem homologia com relação às várias sequências de β -glicosidase publicadas da glicosil hidrolase família 3 (programa BLAST, National Center for

Biotechnology Information; Altschul e outros, 1990).

A inserção dos plasmídeos pALK1713, pALK1924 e pALK1935 foi isolada pela digestão da enzima de restrição e rotulada com digoxigenina de acordo com as instruções do fabricante (Roche, Alemanha). Cerca de 1-2 x 10⁵ placas da biblioteca genômica ampliada de *Acremonium*, *Chaetomium* ou *Thermoascus* foram classificadas, conforme descrito no Exemplo 18. Várias placas positivas foram obtidas, das quais cinco a seis placas fortemente hibridizantes foram purificadas de cada classificação. Os DNAs de fago foram isolados e analisados por hibridização Southern blot. Os fragmentos de restrição hibridizando com relação à sonda foram subclonados no vetor p-Bluescript II KS+ (Stratagene, USA) e as partes revelantes foram sequenciadas. Em todos os casos, o fragmento de fago subclonado contém o gene de comprimento pleno de interesse. A tabela 21 resume as informações das sondas usadas para classificação dos genes de β -glicosidase, clones de fago dos quais os genes foram isolados, fragmentos de restrição escolhidos contendo os genes de comprimento pleno com suas regiões promotora e terminadora, nomes dos plasmídeos contendo o fragmento de fago subclonado e os números de depósito na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Culture Collection (DSM) para as cepas de *E.coli* transportando esses plasmídeos.

Tabela 21. Sondas usadas para clonagem do gene da β -glicosidase, clones de fago e subclone escolhidos, nome do plasmídeo e número de depósito correspondente da cepa *E.coli*.

Gene	Biblioteca genômica	Sonda usada na classificação	Clone do fago	Fragmento subclonado	Plasmídeo	Nº de depósito de <i>E.coli</i>
At cel3A	<i>A. thermophilum</i> ALKO4245	pALK1924	P44	6,0 kb <i>HindIII</i>	pALK1925	DSM 17325
Ct cel3A	<i>C. thermophilum</i> ALKO4261	pALK1935	P51	7,0 kb <i>XbaI</i>	pALK2001	DSM 17667
Ta cel3A	<i>T. aurantiacus</i> ALKO4242	pALK1713	P21	5,3 kb <i>BamHI</i>	pALK1723	DSM 16725

- 5 Informações relevantes dos genes e seqüências de proteína deduzidas (SEQ ID Nº:21-26) são resumidas nas Tabelas 22 e 23, respectivamente. As seqüências de peptídeo das proteínas purificadas de β G-10 (At cel3A) de *Acremonium*, β G-76 (Ct cel3A) de *Chaetomium* e β G-81 (Ta cel5A) de *Thermoascus* foram encontradas nas seqüências de aminoácido deduzidas correspondentes dos genes clonados confirmando que os genes apropriados foram clonados.

Tabela 22. Resumo dos genes de β -glicosidase isolados de *Acremonium thermophilum*, *Chaetomium thermophilum* e *Thermoascus aurantiacus*.

Gene da β -glucosidase	Comprimento com introns (bp) ^(a)	Região de codificação (bp) ^(b)	Número de introns	Comprimentos dos introns (pares de base)	Seq ID Nº:
At cel3A	2821	2583	3	92, 74, 69	23
Ct cel3A	2257	2202	1	52	25
Ta cel3A	3084	2529	7	134, 67, 56, 64, 59, 110, 62	21

- 10 ^(a) O códon STOP está incluído

^(b) O códon STOP não está incluído

Tabela 23. Resumo das seqüências de β -glicosidase deduzidas de *Acremonium thermophilum*, *Chaetomium thermophilum* e *Thermoascus aurantiacus*. ss, seqüência de sinal.

Proteína de β -glucosidase	Nº de aas	Comprimento de ss NN/HMM ^(a)	CBD ^(b)	Peso molecular (MW) previsto (Da, (ss) não incluídas) ^(c)	pl previsto (seqüência de sinal não incluída)	sítios de N-glicosilação putativa	Seq. ID Nº:
At β G_101	861	19/18	Não	91434	5,46	8	24
Ct β G_76	734	20/20	Não	76457	6,3	2	26
Ta β G_81	843	19/19	Não	89924	4,95	8	22

- 15 ^(a) A previsão da seqüência de sinal foi realizada usando o programa SignalP V3.0 (Nielsen e outros, 1997; Bendtsen e outros, 2004); o valor NN foi obtido usando redes neurais e valor HMM usando modelos Markov impedidos.

^(b) Presença de um domínio de ligação de celulose na proteína.

^(c) A seqüência de sinal prevista não está incluída. A previsão foi feita usando

a ferramenta Compute pI/MW no servidor ExPASy (Gasteiger e outros, 2003).

^(d) Os sítios de N-glicosilação putativa N-X-S/T foram previstos usando o programa NetNGlyc 1.0 (Gupta e outros, 2004).

- 5 As seqüências de proteína deduzidas das β -glicosidases de β G-101/Cel3A de *Acremonium*, β G-76/Cel3A de *Chaetomium* e β G-81/Cel3A de *Thermoascus* compartilham homologia com as enzimas da glicosil hidrolase família 3, assim identificando os genes isolados como elementos dessas famílias de genes. As contrapartes mais próximas das β -glicosidases de *Acremonium*, *Chaetomium* e *Thermoascus* são aquelas de *Magnaporthe grisea* (β -glicosidase, AY849670), *Neurospora crassa* (hipotética, XM-324308) e *Talaromyces emersonii* (β -glicosidase, AY072918), respectivamente (Tabela 24). A identidade de seqüência mais alta (73,2%) encontrada foi aquela de β G-76/Cel3A de *C. thermophilum* para proteína hipotética *N. crassa* indicando que novos genes de enzimas foram clonados.

15 Tabela 24. Comparação das β -glicosidases deduzidas de β G-101/Cel3A de *Acremonium thermophilum*, β G-76/Cel3A de *Chaetomium thermophilum* e β G-81/Cel3A de *Thermoascus aurantiacus* com suas contrapartes homólogas. O alinhamento foi realizado usando o programa Needle do pacote de programas EMBOSS. * Indica uma β -glicosidase codificada por um gene clonado nesse trabalho.

Organismo, enzima e número de acesso	Identidade (%)
* <i>Acremonium thermophilum</i> βG_101	100,0
<i>Magnaporthe grisea</i> β -glucosidase, AY849670	73,1
<i>Neurospora crassa</i> hypothetical, XM_330871	71,1
<i>Trichoderma reesei</i> Cel3B, AY281374	65,2
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> βG_81	62,2
<i>Aspergillus aculeatus</i> β -glucosidase, D64088	59,5
<i>Talaromyces emersonii</i> β -glucosidase, AY072918	58,9
<i>Aspergillus oryzae</i> , AX616738	58,2
<i>Acremonium cellulolyticus</i> β -glucosidase, BD168028	57,2
* <i>Chaetomium thermophilum</i> βG_76	40,9

Organismo, enzima e número de acesso	Identidade (%)
<i>Chaetomium thermophilum</i> βG_76	100,0
<i>Neurospora crassa</i> , hypothetical XM_324308	76,9
<i>Magnaporthe grisea</i> , hypothetical XM_364573	70,2
<i>Trichoderma viridae</i> BGI, AY368687	65,8
<i>Acremonium cellulolyticus</i> β -glucosidase, BD168028	41,2
* <i>Acremonium thermophilum</i> β G_101	40,9
<i>Trichoderma reesei</i> Cel3B, AY281374	40,0
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> β G_81	39,9
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> βG_81	100,0
<i>Talaromyces emersonii</i> β -glucosidase, AY072918	73,2
<i>Aspergillus oryzae</i> , AX616738	69,5
<i>Aspergillus aculeatus</i> β -glucosidase, D64088	68,0
<i>Acremonium cellulolyticus</i> β -glucosidase, BD168028	65,7
* <i>Acremonium thermophilum</i> β G_101	62,2
<i>Trichoderma reesei</i> Cel3B, AY281374	57,9
* <i>Chaetomium thermophilum</i> β G_76	39,9

Exemplo 21. Produção de beta-glicosidases recombinantes em *Trichoderma reesei*

Plasmídeos de expressão foram construídos para produção das proteínas recombinantes de β G-101/Cel3A de *Acremonium*, β G-76/Cel3A de *Chaetomium* e β G-81/Cel3A de *Thermoascus* conforme descrito no Exemplo 14. Cassetes de expressão linear (Tabela 25) foram isolados da estrutura do vetor por digestão da enzima de restrição, transformados em *T. reesei* A96 ou A33 (ambas cepas possuindo genes codificando as quatro maiores celulasas CBHI/Cel7A, CBHII/Cel6A, EGI/Cel7B e EGII/Cel5A deletadas) e os transformantes purificados conforme descrito no Exemplo 14.

Tabela 25. Cassetes de expressão construídos para produção de β -glicosidases de β G-101/Cel3A de *Acremonium thermophilum*, β G-76/Cel3A de *Chaetomium thermophilum* e β G-81/Cel3A de *Thermoascus aurantiacus* em *Trichoderma reesei*. A estrutura esquemática dos cassetes de expressão é descrita na figura 2.

β -glicosidase	Plasmídeo de expressão	Tamanho do cassette de expressão	Terminador heterólogo
At β G_101	pALK1933	10,5 kb <i>NotI</i>	300 bp (<i>HindIII</i>)
Ct β G_76	pALK2004	10,1 kb <i>EcoRI</i>	528 bp (<i>XbaI</i>)
Ta β G_81	pALK1914	10,9 kb <i>EcoRI</i>	452 bp (<i>ApoI</i>)

^(a) O cassete de expressão para transformação de *T. reesei* foi isolado da estrutura de vetor por digestão com *EcoRI* ou *NotI*.

^(b) É indicado o número de nucleotídeos após o códon STOP do gene clonado que são incluídos no cassete de expressão. O sítio de restrição na região 3' do gene que foi usado na construção do cassete de expressão é indicado entre parênteses.

A produção da beta-glicosidase dos transformantes foi analisada dos sobrenadantes de cultura dos cultivos de frascos de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram como no Exemplo 14 e a atividade da enzima da proteína recombinante usando substrato de 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo conforme descrito em Bailey e Nevalainen 1981. A produção das proteínas recombinantes foi também detectada a partir dos sobrenadantes de cultura por SDS-eletroforese de gel poliacrilamida. Além disso, a expressão de β G-81 de *Thermoascus* foi verificada por análise Western blot com anticorpos anti- β G-81 conforme descrito no Exemplo 19. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por Southern blotting empregando o cassete de expressão como uma sonda.

O pH ótimo das β -glicosidases produzidas heterologicamente foi determinado no tampão universal de McIlvaine dentro de uma faixa de pH de 3,0-8,0 usando 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como substrato. Os pHs ótimos para β G-101 de *Acremonium*, β G-76 de *Chaetomium* e β G-81 para *Thermoascus* são 4,4, 5,5 e 4,5 respectivamente (figura 7A). A temperatura

ótima para atividade enzimática dessas β -glicosidases foi determinada na faixa de temperatura de 50-85°C conforme descrito acima. A atividade mais alta das enzimas foi determinada como sendo a 70°C, 65°C e 75°C para β G-101/Cel45A de *Acremonium*, β G-76/Cel3A de *Chaetomium* e β G-81/Cel3A de *Thermoascus*, respectivamente (Figura 7B).

Os transformantes escolhidos foram cultivados, conforme descrito no Exemplo 14, em um bioreator de 2 litros por quatro dias (28°C, pH 4,2) para obter material para os testes de aplicação.

Exemplo 22. Clonagem dos genes de xilanase de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 e *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Métodos de biologia molecular padrão foram empregados conforme descrito no Exemplo 13. A construção das bibliotecas genômicas de *Acremonium* foi descrita no Exemplo 12.

Os peptídeos derivados da xilanase de *Acremonium* compartilharam homologia com várias xilanasas da glicosil hidrolase família 10, tais como *Humicola grisea* XYNI (AB001030). Todos os peptídeos derivados da xilanase de *Thermoascus* eram completamente idênticos à sequência de *Thermoascus aurantiacus* XYNA publicada (AJ132635) assim identificando a proteína purificada como a mesma enzima. Em razão disso, o gene da xilanase de *Thermoascus* foi ampliado por PCR a partir do DNA genômico.

De modo a ampliar a sonda para classificação do gene da xilanase de *Acremonium* a partir das bibliotecas genômicas, iniciadores de degeneração foram designados com base nas sequências de peptídeo (Exemplo 11, Tabela 5). A ordem dos peptídeos na sequência da proteína e a natureza de sentido ou anti-sentido correspondente dos iniciadores foi deduzida da comparação com sequência de *Humicola insolens* XYNI (AB001030). A sequência do iniciador de sentido (GAYGGYGAYGCSACYTAYATG) se baseia no Peptídeo 3 (aminoácidos 2-8) e iniciador de anti-sentido (YTTYT-GRTCRTAYTCSAGRTTSTA) no Peptídeo 1 (aminoácidos 4-11).

Um produto da PCR de tamanho esperado (estimado da sequência de homóloga de *Humicola insolens* XYNI, AB001030) foi obtida da reação. Esse fragmento de DNA de cerca de 0,7 kb foi clonado no vetor p-

CR4-TOPO^(R) TA (Invitrogen, USA) resultando no plasmídeo pALK1714 e foi caracterizado por seqüenciamento. A seqüência de aminoácido deduzida do produto da PCR tinha homologia com relação a todas seqüências de xilana-se publicadas da glicosil hidrolase família 10 (programa BLAST, National Center for Biotechnology Information; Altschul e outros, 1990).

A inserção do plasmídeo pALK1714 foi isolada pela digestão da enzima de restrição e rotulada com digoxigenina de acordo com as instruções do fabricante (Roche, Alemanha). Cerca de $1-2 \times 10^5$ placas da biblioteca genômica ampliada de *Acremonium* foram classificadas conforme descrito no Exemplo 18. Várias placas positiva foram obtidas, das quais cinco placas hibridizando fortemente foram purificadas. DNAs do fago foram isolados e analisados por hidridização Southern blot. Um fragmento de restrição 3,0 kb *Xba*I hibridizando com relação à sonda foi subclonado no vetor pBluescript II KS+ (Stratagene, USA) resultando no plasmídeo pALK1725. As partes relevantes de pALK1725 foram seqüenciadas e encontradas como contendo o gene de comprimento pleno *xyn10A* do *Acremonium thermophilum* (SEQ ID Nº:19). O número do depósito da cepa *E.coli* contendo pALK1725 na

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Culture Collection (DSMZ) foi o DSM 16726.

O gene *xyn10A* de *Thermoascus aurantiacus* (SEQ ID Nº:17) foi ampliado diretamente do DNA genômico isolado por reação da PCR. Os iniciadores à frente (TTATACCGCGGGAAGCCATGGTTCGACCAACGATCC-TAC) e reverso (TTATAGGATCCACCGGTCTATACTCACTGCTG-CAGGTCCTG) que foram usados na ampliação do gene foram designados com base no gene *xynA* de *T. aurantiacus* publicado (AJ132635). As misturas da reação da PCR continham tampão 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM (NH₄)₂SO₄, Triton 0,1% X-100, 1,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTPs, 1 µM cada iniciador, 1 unidade de DNA polimerase PhusionTM DNA (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 0,5 µg de DNA genômico de *Thermoascus*. As condições para reações da PCR foram como se segue: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto de recombinação a 60-66°C, 3 minutos de extensão a 72°C e uma extensão final a

72°C por 10 minutos. O produto ampliado de 1,9 kb contendo o gene exato (do códon START para STOP) foi clonado como um fragmento *SacII-BamHI* no vetor pBluescript II KS+. Três clones independentes foram seqüenciados e um clone foi selecionado e designado como pALK1715. O número de depósi-
5 to da cepa *E.coli* contendo pALK1715 na Deutsche Sammlung von Mikroor-
ganismen und Zellkulturen GmbH Culture Collection é DSM 16724.

Informações relevantes dos genes e seqüências de proteína dedu-
zidas (SEQ ID Nº:17-20) são resumidas nas Tabelas 26 e Tabela 27, respecti-
vamente. As seqüências de peptídeo das proteínas XYN-60 de *Acremonium* e
10 XYN-30 de *Thermoascus* foram encontradas nas seqüências de aminoácido
deduzidas correspondentes dos genes clonados (*At xyn10A* e *Ta xyn10A*, res-
pectivamente) confirmando que os genes apropriados foram clonados.

Tabela 26. Resumo dos genes de xilanase isolados de *Acremonium thermophilum* e *Thermoascus aurantiacus*.

Gene da xila- nase	Comprimento com introns (bp) ^(a)	Região de codificação (bp) ^(b)	Número de in- trons	Comprimentos dos introns (pares de base)	Seq ID Nº:
<i>At xyn10A</i>	1471	1248	2	135, 85	19
<i>Ta xyn10A</i>	1913	987	10	73, 74, 68, 103, 69, 65, 93, 66, 100, 212	17

- 15 (a O códon STOP está incluído
(b O códon STOP não está incluído)

Tabela 27. Resumo das seqüências de xilanase deduzidas de *Acremonium thermophilum* e *Thermoascus aurantiacus*. ss, seqüência de sinal.

Proteína da xilanase	Nº de aas	Compri- mento de ss NN/HMM ^(a)	CBD ^(b)	Peso molecu- lar (MW) pre- visto (Da, (ss) não incluídas) ^(c)	pl previsto (seqüência de sinal não incluída)	sítios de N-glicosi- lação putativa	Seq. ID Nº:
<i>At xyn_60</i>	416	19/19	Sim, W385 a L416	42533	6,32	1-2	20
<i>Ta xyn_30</i>	329	26 ^(e)	Não	32901	5,81	0	18

^(a) A previsão da sequência de sinal foi realizada usando o programa SignalP V3.0 (Nielsen e outros, 1997; Bendtsen e outros, 2004); o valor NN foi obtido usando redes neurais e valor HMM usando modelos Markov impedidos.

5 ^(b) É indicada a presença de um domínio de ligação de carboidrato CBD e dos aminoácidos de CBD C-terminal (numeração de acordo com o polipeptídeo de comprimento pleno)

^(c) A sequência de sinal prevista não está incluída. A previsão foi feita usando a ferramenta Compute pI/MW no servidor ExPASy (Gasteiger e outros, 2003).

10 ^(d) Os sítios de N-glicosilação putativa N-X-S/T foram previstos usando o programa NetNGlyc 1.0 (Gupta e outros, 2004).

^(e) De acordo com Hong e outros, 1999.

As seqüências de proteína deduzidas das xilanases de *Acremonium* e *Thermoascus* compartilham homologia com várias enzimas de glicosil hidrolase da família 10, identificando os genes correspondentes como

15 elementos das xilanases família 10. A contraparte mais próxima de XYN-60/Xyn10A de *Acremonium* encontrada é a XYLI de *Humicola grisea* (AB001030) mostrando 67,1% de identidade com XYN-60 (Tabela 28). A seqüência de proteína prevista da xilanase de XYN-3-/Xyn10A de *Thermo-*

20 *ascus aurantiacus* é completamente idêntica aquela de XYNA de *T.aurantiacus* publicada (P23360, Tabela 28). A homologia mais próxima foi encontrada em uma seqüência de xilanase de *Aspergillus niger* (A62445, 69,7% de identidade).

Tabela 28. Comparação das xilanases deduzidas de XYN-60/Xyn10A de *Acremonium thermophilum* e XYN-30/Xyn10A de *Thermoascus aurantiacus* com suas contrapartes homólogas. O alinhamento foi realizado usando o programa Needle do pacote de programas da EMBOSS. *Indica uma xilanase codificada por um gene clonado nesse trabalho.

Organismo, enzima e número de acesso	Identidade (%)
* <i>Thermoascus aurantiacus</i> XYN_30	100,0
<i>Thermoascus aurantiacus</i> XynA, P23380	100,0
<i>Thermoascus aurantiacus</i> XynA, AF127529	99,4
<i>Aspergillus niger</i> xylanase, A62445	69,7
<i>Aspergillus aculeatus</i> xylanase, AR137844	69,9
<i>Aspergillus terreus</i> fam 10 xyn, DQ087436	65,0
<i>Aspergillus sojae</i> , XynXI AB040414	63,8
<i>Penicillium chrysogenum</i> xylanase, AY583585	62,5
* <i>Acremonium thermophilum</i> XYN_60	100,0
<i>Humicola grisea</i> XYL I, AB001030	67,1
<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15, hypothetical XM_364947	63,8
<i>Aspergillus aculeatus</i> xylanase, AR149839	53,7
<i>Talaromyces emersonii</i> xylanase, AX403831	51,8
<i>Gibberella zeae</i> xylanase, AY575962	51,4
<i>Magnaporthe grisea</i> XYL5, AY144348	48,5
<i>Talaromyces emersonii</i> , AX172287	46,9

Exemplo 23. Produção de xilanases recombinantes em *Trichoderma reesei*

Os plasmídeos de expressão foram construídos para produção de proteínas recombinantes de XYN-60/Xyn10A de *Acremonium* e XYN-30/Xyn10A de *Thermoascus* conforme descrito no Exemplo 14. Cassetes de expressão linear (tabela 29) foram isolados da estrutura do vetor por digestão da enzima de restrição, transformada em *T.reesei* A96 e transformantes purificados conforme descrito no Exemplo 14.

Tabela 29. Cassetes de expressão construídos para produção de xilanases de XYN-60/Xyn10A de *Acremonium thermophilum* e XYN-30/Xyn10A de *Thermoascus aurantiacus* no *Trichoderma reesei*. A estrutura esquemática dos cassetes de expressão é descrita na figura 2.

Xilanase	Plasmídeo de expressão	Tamanho do cassette de expressão ^(a)	Terminador heterólogo ^(b)
At XYN_60	pALK1912	9,0 kb	150 bp (<i>Bam</i> HI)
Ta XYN_30	pALK1913	9,3 kb	nenhum

5 ^(a) O cassette de expressão para transformação de *T. reesei* foi isolado da estrutura de vetor por digestão com *Eco*RI.

^(b) É indicado o número de nucleotídeos após o códon STOP do gene clonado que são incluídos no cassette de expressão. O sítio de restrição na região 3' do gene que foi usado na construção do cassette de expressão é indicado entre parênteses.

A produção da xilanase dos transformantes foi analisada dos sobrenadantes de cultura dos cultivos de frascos de agitação (50 mL). Os transformantes cresceram como no Exemplo 14 e a atividade da enzima da proteína recombinante foi medida a partir do sobrenadante de cultura como a liberação dos açúcares de redução a partir da xilana de bétula (1% peso/volume) a 50°C em tampão de citrato a 50 mM, pH 5,3 conforme descrito por Bailey e Poutanen 1989. A produção da proteína recombinante foi também analisada do sobrenadante de cultura por SDS-eletroforese de gel poliacrilamida. Além disso, a expressão de ambas xilanases foi determinada por análise Western blot com anticorpos anti-XYN-30 ou anti-XYN-60 conforme descrito no Exemplo 19. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram analisados por Southern blotting usando o cassette de expressão como uma sonda.

XYN-30/Xyn10A de *Thermoascus* foi produzida em *T. reesei* e o pH ótimo da proteína produzida heterologicamente foi determinado no tampão universal McIlvaine dentro de uma faixa de pH de 3,0-8,0 usando xilana de bétula como substrato (figura 8A). O pH ótimo foi determinado como sendo de 4,5. A temperatura ótima para atividade enzimática de XYN-30 foi determinada como sendo de 75°C (figura 8B).

Os transformantes escolhidos foram cultivados, conforme descrito no Exemplo 14, em um bioreator de 2 litros por quatro dias (28°C, pH 4,2) para obter material para os testes de aplicação.

Exemplo 24. Desempenho das celobioidrolases recombinantes na hidrólise

O desempenho das celobioidrolases recombinantes purificadas foi avaliado nos estudos de hidrólise com enzimas *T.reesei* purificadas. A hidrólise foi realizada com misturas controladas de enzimas purificadas nos vários substratos pré-tratados. Os filtrados de cultura de *T.reesei* contendo diferentes enzimas de CBH/Cel7 clonadas foram obtidos conforme descrito nos Exemplos 14 e 15 e as enzimas de CBH foram purificadas por cromatografia de afinidade conforme descrito no Exemplo 2. Além disso, celulasas de *T.reesei* puras (purificadas conforme descrito Suurnäkki e outros, 2000) foram empregados nas misturas de enzima. As celobioidrolases no experimento foram:

(Ta Cel7A) de CBH de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242
(Ta Cel7A) de CBH de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242
com CBD de (Ta Cel7A +Tr CBD) de *Trichoderma reesei* geneticamente anexado

(Ta Cel7A) de CBH de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242
com CDB de (Ta Cel7A +Ct CBD) e de (At Cel7A) geneticamente anexados

(At Cel7A) de CBH de *Acremonium thermophilum* ALKO4245

(Ct Cel7A) de CBH de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265

Cada CBH/Cel7 a ser testado (dosagem de 14,5 mg/g de matéria seca de substrato) foi usado tanto em conjunto com EGII/Cel5A de *T.reesei* (3,6 mg/g) ou com uma mistura contendo EGI/Cel7B *T. reesei* (1,8 mg/g), EGII/Cel5A (1,8 mg/g), xilanase pl 9 (Tenkanen e outros, 1992) (5.000 nkat/g) e acetil xilana estearase (AXE) (Sundberg and Poutanen, 1991) (250 nkat/g). Todas misturas foram suplementadas com β -glicosidase adicional a partir de uma preparação de enzima comercial Novozym 188 (176 nkat/g d.w.). Tubos em triplicata contendo a mistura de enzima e 10 mg (matéria seca)/mL de substrato suspenso em 0,05 M de acetato de sódio foram incubados na mistura por agitação magnética a 45°C por 48 horas. Amostras de referência com

enzimas inativadas e substratos correspondentes foram também preparados. A liberação dos produtos de hidrólise foi medida como açúcares de redução com método de DNS usando glicose como padrão (Tabela 30).

Os substratos que se seguem foram usados no experimento:

5 Celulose cristalina (Avicel)

Fibra de espruce pré-tratada com vapor e lavada (impregnação com 3% peso/peso de SO₂ por 20 minutos, seguido por pré-tratamento de vapor a 215°C por 5 minutos), matéria seca 25,9% (ESPRUCE).

Fibra de palha de milho oxidada, úmida e lavada (WOCS).

10 Fibra de salgueiro pré-tratada com vapor e lavada (pré-tratamento por 14 minutos a 210°C), matéria seca a 23,0% (SALGUEIRO).

Tabela 30. Produtos de hidrólise com enzimas de CBH (45°C, pH 5,0). Produtos de reação após 48 horas de hidrólise como açúcares de redução (mg/mL), glicose medida como padrão. Abreviaturas: CBH = celobioidrolase; EGI = (Cel7B) de endoglicanase I de *T. reesei*, EGII = (Cel5A) de endoglicanase II de *T. reesei*; bG = β -glicosidase (da Novozym 188); XYL= xilanase pl 9 (XYN II) de *T. reesei*, AXE = acetil xilana esterase de *T. reesei*; nd = não realizado.

Enzimas		Substratos			
CBH	Enzimas adicionais	Avicel	Espruce	WOCS	Salgueiro
Ta Cel7A	EGII, bG	2,0	2,0	2,8	2,0
Ta Cel7A + TrCBD	EGII, bG	5,8	4,0	4,4	4,0
Ta Cel7A + CtCBD	EGII, bG	4,9	3,7	4,6	3,7
At Cel7A	EGII, bG	5,3	3,3	4,5	3,3
Ct Cel7A	EGII, bG	6,0	2,6	3,4	2,6
Cel7A de <i>T. reesei</i>	EGII, bG	4,7	2,9	2,9	2,9
Ta Cel7A	EGII, EGI, XYL, AXE, bG	nd	nd	4,3	2,8
Ta Cel7A + TrCBD	EGII, EGI, XYL, AXE, bG	nd	nd	7,2	5,9
Ta Cel7A + CtCBD	EGII, EGI, XYL, AXE, bG	nd	nd	7,2	5,6
At Cel7A	EGII, EGI, XYL, AXE, bG	nd	nd	6,4	5,4
Ct Cel7A	EGII, EGI, XYL, AXE, bG	nd	nd	5,6	4,0
Cel7A de <i>T. reesei</i>	EGII, EGI, XYL, AXE, bG	nd	nd	6,0	4,1

Na tabela 30, as celobioidrolases diferentes foram comparadas com base na mesma dosagem de proteína na hidrólise. Os resultados mostram que nos substratos celulósicos (Avicel e fibra de espruce) Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* com CBD anexado geneticamente mostrou claramente hidrólise superior a *T.reesei* CBHI/Cel7A. Sem CBD, Cel7A de *T.aurantiacus* foi menos eficaz nesses substratos. O desenvolvimento das celobioidrolases de *Acremonium thermophilum* e *Chaetomium thermophilum* foi também melhor em relação aquele de CBHI/Cel7A de *T.reesei* nos vários substratos; especificamente, Cel7A de *C. thermophilum* mostrou alta eficiência na celulose pura (Avicel).

No caso de substratos contendo quantidades notáveis de hemicelulose (salgueiro e palha de milho) as enzimas CBH/Cel7 precisaram claramente da adição de ambas hemicelulolases e endoglucanases para desempenhar seu papel com eficiência. Caso nenhuma hemicelulase adicional estiver presente, Cel7A de *T.aurantiacus* com CBD geneticamente anexado mostrou nova e claramente hidrólise mais alta. Com as enzimas de degradação de hemicelulose mais importantes (xilanase, acetil xilana esterase e E-GI) Cel7A de *T.aurantiacus* com CBD geneticamene anexado teve novo desempenho com eficiência mais alta. Cel7A de *C. thermophilum* foi mais eficiente que enzima *T. reesei* e Cel7A de *C. thermophilum* produziu produtos de hidrólise no mesmo nível que CBHI/Cel7A de *T. reesei*. O domínio de ligação de celulose de *T. reesei* mostrou fornecer eficiência ligeiramente melhor em relação a CBD de *C.thermophilum* no desempenho hidrolítico de Cel7A de *T.aurantiacus*, mesmo que a diferença seja pequena.

Pode ser concluído que, quando CBHI/Cel7A foi substituída na mistura de enzimas de *Trichoderma* pelas celobioidrolases produzidas aqui, a eficiência da hidrólise conforme julgada por essas disposições experimentais foi claramente melhorada no caso de Cel7A de *T. aurantiacus* com CBD geneticamente anexado e também aperfeiçoou no caso de Cel7A de *A. thermophilum* e Cel7A de *C. thermophilum*. Considerando-se também a melhor estabilidade da temperatura das celobioidrolases produzidas aqui, os resultados indicam que o desempenho das misturas de enzimas de celulase em

temperaturas superiores a 45°C pode ser claramente aperfeiçoado por emprego das celobioidrolases produzidas aqui.

Exemplo 25. Desempenho das endoglicanases recombinantes na hidrólise

5 As preparações contendo as endoglicanases foram comparadas em estudos de hidrólise misturadas com as enzimas CBH/Cel7 e CBH/Cel6 purificadas em vários substratos pré-tratados. Os filtrados de cultura de *T. reesei* contendo diferentes enzimas de endoglicanase clonadas foram obtidas conforme descrito no Exemplo 19. As enzimas foram enriquecidas por
10 remoção das proteínas termoestáveis das misturas por um tratamento térmico (60°C, 2 horas, pH 5) e o sobrenadante foi usado para estudos de hidrólise. Além disso, celulases de *T. reesei* (purificadas como descrito por Suurnäkki e outros, 2000) foram empregados nas misturas de enzima. As endoglicanases usadas no experimento eram:

15 At EG-40/Cel45A (ALKO4245 EG-40) de endoglicanase *Acremonium thermophilum* ALKO4245

Semelhante a At EG-40/Cel45B (semelhante a ALKO4245 EG-40) de endoglicanase de *Acremonium thermophilum* ALKO4245

20 Endoglicanase de Ta EG-28/Cel5A (ALKO4242 EG-28) de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242.

Os substratos que se seguem foram usados no experimento:

Fibra de espruce pré-tratada em vapor e lavada (impregnação com SO₂ a 3% por 20 minutos, seguido por pré-tratamento com vapor a 215°C por 5 minutos), matéria seca a 25,9% (ESPRUCE).

25 Fibra de palha de milho explodida em vapor (pré-tratamento em vapor a 210°C por 5 minutos, matéria seca 31,0% (SECS).

As endoglicanases a serem estudadas (dosagem de 840 nkat/g de matéria seca, com base na atividade da endoglicanase contra HIEC de acordo com IUPAC, 1987) foram também usadas com celobioidrolases de *T. reesei* (CBHI/Cel7A, 8,1 mg/g d.m. e CBHII/Cel6A, 2.0 mg/g d.m.) ou com Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* com CBD de *T. reesei* geneticamente
30 (10,1 mg/g d.m.). EGI (Cel7B) e EGII (Cel5A) de *T. reesei* purificados

(Suurnäkki e outros, 2000) foram também incluídos nos experimentos para comparação. Todas as misturas foram suplementadas com β -glicosidase adicional da Novozym 188 (para fabricar a dosagem de β -glicosidase de 560 nkat/g d.w., a dosagem relativamente alta foi usada para compensar as diferenças nas atividades de base das diferentes preparações de EG). Tubos em triplicata foram incubados em mistura a 45°C por 48 horas e amostras de referência com enzimas inativadas e substratos correspondentes foram preparadas. A liberação de produtos de hidrólise foi medida nos açúcares de redução com método DNS usando glicose como padrão (Tabela 31).

- 10 **Tabela 31.** Produtos de hidrólise com preparações diferentes de endoglicanase quando usadas em conjunto com celobioidrolases de *T. reesei* ou com Cel7A de *T. aurantiacus* abrigando CBD de *T. reesei*. Produtos de reação após 48 horas de hidrólise como açúcares de redução (mg/mL), glicose medida como padrão. Abreviaturas: CBHI = (Cel7A) de celobioidrolase I de *T. reesei*; CBHII = (Cel6A) de celobioidrolase II de *T. reesei*; EGI = (cel7B) de endoglicanase I de *T. reesei*; EGII = (Cel5A) de endoglicanase II de *T. reesei*; bG = β -glicosidase (da Novozym 188); nd = não realizado.

Enzimas		Substrato	
CBH/Cel7 de endoglicanase		ESPRUCE	SECS
EG não adicionado	CBHI e CBHII de <i>T. reesei</i>	2,4	3,2
EGI	CBHI e CBHII de <i>T. reesei</i>	3,5	4,6
EGII	CBHI e CBHII de <i>T. reesei</i>	3,8	3,5
At EG_40	CBHI e CBHII de <i>T. reesei</i>	4,9	4,3
Semelhante a At EG-40	CBHI e CBHII de <i>T. reesei</i>	4,5	4,8
Ta EG_28	CBHI e CBHII de <i>T. reesei</i>	3,0	3,9
EG não adicionado	Cel7A de <i>T. aurantiacus</i> + Tr CBD	1,8	2,1
EGI	Cel7A de <i>T. aurantiacus</i> + Tr CBD	nd.	4,2
EGII	Cel7A de <i>T. aurantiacus</i> + Tr CBD	3,2	nd.
At EG_40	Cel7A de <i>T. aurantiacus</i> + Tr CBD	4,8	4,0
Ta EG_28	Cel7A de <i>T. aurantiacus</i> + Tr CBD	1,5	nd.

Na tabela 31, as celobioidrolases diferentes foram comparadas com base na mesma dosagem de atividade na hidrólise. Isso pode favorecer

as enzimas com baixa atividade específica contra o substrato (hidroxietil celulose) usadas no ensaio e subestimar a eficiência das enzimas com alta atividade específica contra hidroxietil celulose. Em qualquer caso, os resultados mostram que as endoglicanases de *Acremonium thermophilum* têm desempenho muito bom na hidrólise quando tem efeito em conjunto com ambas celobioidrolases usadas na mistura. As endoglicanases de *A. thermophilum* apresentam desempenho semelhante à EGI/Cel7B de *T. reesei* que é uma enzima muito eficiente no substrato de palha de milho contendo hemicelulose, devido à sua forte atividade colateral da xilanase. Cel5A (AL-KO4242 EG-28 da endoglicanase de *T. aurantiacus* mostrou hidrólise mais baixa em relação as enzimas de *T. reesei*.

Pode ser concluído que as endoglicanases de *A. thermophilum* têm desempenho de eficiência comparável ou melhor quando comparadas às enzimas de *Thichoderma* correspondentes na hidrólise conforme julgado por essa disposição experimental. Considerando-se também a estabilidade da temperatura das endoglicanases descritas aqui, os resultados indicam que o desempenho das misturas da enzima celulase em temperaturas superiores a 45°C pode ser melhorado por emprego das endoglicanases descritas aqui.

20 **Exemplo 26. Hidrólise de espruce pré-tratado com vapor em temperaturas altas**

Fibra de espruce explodida em vapor e lavada (impregnação com 3% peso/peso de SO₂ por 20 minutos, seguido por pré-tratamento com vapor a 215°C por 5 minutos), com matéria seca de 25,9% foi suspensa em 5 mL de 0,05 M tampão acetato de sódio na consistência de 10 mg/mL. Esse substrato foi hidrolisado usando diferentes misturas de enzima nos tubos de teste com agitação magnética no banho de água ajustado em diferentes temperaturas por 72 horas. Para cada ponto da amostra, uma triplicata dos tubos de teste foi retirada da hidrólise, fervida por 10 minutos a fim de terminar a hidrólise da enzima, centrifugada e o sobrenadante foi analisado quanto aos produtos de reação de hidrólise. Os espaços em branco contendo o substrato sozinho (apenas tampão foi adicionado ao invés das enzimas) fo-

ram também incubados nas condições correspondentes.

Uma mistura de celulases termofílicas foi preparada usando os seguintes componentes:

5 Preparação de CBH/Cel7 termofílica contendo *Thermoascus au-*
rantiacus ALKO4242 Cel7A com CBD geneticamente anexado de C-
BHI/Cel7A de *T. reesei*. A preparação da proteína foi produzida conforme
descrito no Exemplo 15, e purificada de acordo com o Exemplo 2 resultando
na preparação de Ta Cel7A + Tr CBD purificada com teor de proteína de 5,6
mg/mL.

10 A preparação de endoglicanase termofílica contendo endoglica-
nase de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 At EG-40/Cel45A. A proteína
foi produzida em *T. reesei* conforme descrito no Exemplo 19. A fim de enri-
quecer os componentes termofílicos, o meio de cultura gasto foi tratado com
aquecimento (60°C por 2 horas). A preparação obtida continha 4,9 mg/mL de
15 proteína e atividade de endoglicanase (de acordo com IUPAC, 1987) 422
nkat/mL.

Preparação de β -glicosidase termofílica obtida conforme descrito
no Exemplo 21 contendo β -glicosidase Ta β G-81/Cel3A de *Thermoascus*
aurantiacus ALKO4242. A fim de enriquecer os componentes termofílicos, o
20 caldo fermentado foi tratado com aquecimento (65°C por duas horas). A pre-
paração obtida continha 4,3 mg/mL de proteína e a atividade da β -
glicosidase de 6270 nkat/mL (de acordo com Bailey e Linko, 1990).

Essas preparações de enzima foram combinadas como se se-
gue (por 10 mL de mistura): preparação de CBH/Cel7 4,51 mL, preparação
25 de endoglicanase, 5,19 mL e preparação de β -glicosidase 0,29 mL. Essa
mistura foi usada como "MISTURA 1" das enzimas termofílicas.

Como uma comparação e referência, uma mistura do estado da
técnica comercial de enzimas de *Trichoderma reesei* foi construída combi-
nando (por 10 mL): 8,05 mL de Celluclast 1,5 L FG (da Novozymes A/S) e
30 1,95 mL de Novozym 188 (da Novozymes A/S). A mesma foi denominada
como "ENZIMAS DE *T. REESEI*".

As enzimas foram dosadas com base na atividade FPU das mis-

turas: "MISTURA 1" usando a dosagem de 5,5 FPU por 1 grama de matéria seca no substrato de espruce e "ENZIMAS *T. REESEI*" usando 5,8 FPU por 1 grama de matéria seca no substrato de espruce.

5 As amostras foram retiradas da hidrólise após 24, 48 e 72 horas e tratadas conforme descrito acima. Os produtos de hidrólise foram quantificados usando o ensaio para reduzir os açúcares (Bernfeld, 1955), empregando glicose como padrão. A quantidade de produtos de hidrólise como açúcares de redução é apresentada na figura 9.

10 Os resultados mostram claramente o melhor desempenho das enzimas descritas aqui em comparação às enzimas de *Trichoderma* do estado da técnica a 55°C e 60°C no substrato de espruce. Com base na análise de HPLC, o rendimento máximo dos açúcares do substrato seria de 5,67 mg por 10 mg de substrato de espruce seco. Em razão da dosagem relativamente baixa da enzima os rendimentos de açúcar final foram claramente
15 mais baixos. Para enzimas termoestáveis, o rendimento do açúcar com base no ensaio do açúcar de redução foi de 66% e 57% do teórico em 55°C e 60°C, respectivamente. Para as enzimas de *Trichoderma* do estado da técnica, o mesmo foi de apenas 31% e 11% a 55°C e 60°C, respectivamente.

20 **Exemplo 27. Hidrólise de palha de milho pré-tratado com vapor em temperaturas altas**

Fibra de palha de milho explodida em vapor (tratamento a 195°C por 5 minutos), com matéria seca de 45,3% foi suspensa em 5 mL de 0,05 tampão de acetato de sódio na consistência de 10 mg/mL. Os tratamentos e medições foram realizados conforme descrito no Exemplo 26.

25 Uma mistura das celulases termofílicas descritas aqui foi construída usando os componentes que se seguem:

Preparação termofílica de CBH contendo Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 com CBD geneticamente anexado de C-BHI/Cel7A de *T. reesei* (Ta Cel7A + Tr CBD, Exemplo 15). O teor de proteína da preparação foi de 31 mg/mL.

Preparação da endoglicanase termofílica contendo endoglicanase At EG-40/Cel45A de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 foi obtida

conforme descrito no Exemplo 19. A preparação de enzima concentrada continha atividade de endoglicanase (de acordo com IUPAC, 1987) de 2057 nkat/mL.

5 Preparação de β -glicosidase termofílica contendo β -glicosidase de Ta BBG-81/Cel3A de *Thermoascus aurantiacus* ALKO 4242 foi obtida conforme descrito no Exemplo 21 contendo atividade de β -glicosidase (de acordo com Bailey and Linko, 1990) de 11.500 nkat/mL.

10 Produto de xilanase termofílica contendo uma xilanase AM24 originária de *Nonomuraea flexuosa* DSM43186. O produto foi preparado por emprego de uma cepa de *Trichoderma reesei* recombinante que havia sido transformada com o cassete de expressão pALK1502, conforme descrito no WO2005/100557. O produto sólido foi dissolvido na matéria para obter uma solução a 10% e uma preparação de enzima com atividade de xilanase (analisada de acordo com Bailey e outros, 1992) de 208.000 nkat/mL foi obtida.

15 Essas preparações de enzima foram combinadas como se segue (por 10 mL de mistura): preparação de CBH/Cel7 7,79 mL, preparação de endoglicanase 0,96 mL, preparação de β -glicosidase 1,14 mL e preparação da xilanase 0,31 mL. Essa mistura foi usada como "MISTURA 2" das enzimas termofílicas.

20 Como uma comparação e referência, uma mistura do estado da técnica comercial de enzimas de *Trichoderma reesei* foi construída combinando (por 10 mL), 8,05 mL de Celluclast 1,5 L FG (da Novozymes A/S) e 1,95 mL de Novozym. 188 (da Novozymes A/S). A mesma foi denominada como "ENZIMAS DE *T. REESEI*".

25 As amostras foram retiradas da hidrólise após 24, 48 e 72 horas e tratadas conforme descrito acima. Os produtos de hidrólise foram quantificados usando o ensaio para reduzir os açúcares (Bemfeld, 1955), empregando glicose como padrão. A quantidade de produtos de hidrólise como açúcares de redução é apresentada na figura 10.

30 Os resultados mostram claramente o melhor desempenho das enzimas descritas aqui em comparação às enzimas de *Trichoderma* do estado da técnica. A 55°C a mistura de enzimas termofílicas mostrou hidrólise

mais eficiente em comparação às enzimas *T. reesei*. A hidrólise foi mais rápida e rendimentos de açúcar maiores foram também obtidos. Com base na análise de HPLC, o rendimento máximo dos açúcares (incluindo os açúcares solúveis livres no substrato não lavado que foi usado) do substrato seria de 5,73 mg por 10 mg de substrato seco. Assim, a hidrólise pelas enzimas da MISTURA 2 estava quase completa em 48 horas. A 55°C e 57,5°C as enzimas termofílicas descritas aqui mostraram também um desempenho claramente melhor na hidrólise em relação às enzimas de *Trichoderma* do estado da técnica.

10 **Exemplo 28. Hidrólise de palha de milho pré-tratada em temperaturas altas usando mistura com uma xilanase termoestável**

O procedimento explicado no Exemplo 27 foi repetido, exceto que o produto de xilanase XT 02026A3 foi substituído por preparação termofílica de xilanase contendo xilanase Ta XYN-30/Xyn10A de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 produzida em *T. reesei*. O caldo fermentador, produzido conforme descrito no Exemplo 23 continha atividade de xialanase de 132.000 nkat/mL (ensaiado de acordo com Bailey e outros, 1992).

Essas preparações de enzima foram combinadas como se segue (por 10 mL de mistura): preparação de CBH/Cel7 7,64 mL, preparação de endoglicanase 0,96 mL, preparação de β -glicosidase 1,15 mL e preparação da xilanase 0,25 mL. Essa mistura foi usada como "MISTURA 3" das enzimas termofílicas.

Como uma comparação e referência, uma mistura do estado da técnica comercial de enzimas de *Trichoderma reesei* foi construída combinando (por 10 mL), 8,05 mL de Celluclast 1,5 L FG (da Novozymes A/S) e 1,95 mL de Novozym 188 (da Novozymes A/S). A mesma foi denominada como "ENZIMAS DE *T. REESEI*".

As amostras foram retiradas da hidrólise após 24, 48 e 72 horas e tratadas conforme descrito acima. Os produtos de hidrólise foram quantificados usando o ensaio para reduzir os açúcares (Bemfeld, 1955), empregando glicose como padrão. Os resultados dos brancos do substrato foram subtraídos das amostras com enzimas, e a concentração dos produtos de

hidrólise como açúcares de redução é apresentada na figura 11.

Os resultados mostram claramente o melhor desempenho da mistura das enzimas descritas aqui em comparação às enzimas de *Trichoderma* do estado da técnica. A 45°C a mistura de enzimas termofílicas mostrou hidrólise mais eficiente em comparação às enzimas *T. reesei*. A 55°C e 60°C as enzimas termofílicas descritas aqui mostraram também um desempenho claramente melhor na hidrólise em relação às enzimas de *Trichoderma* do estado da técnica. O desempenho da nova mistura de enzima a 60°C estava no mesmo nível de desempenho das enzimas do estado da arte a 45°C.

Exemplo 29. Hidrólise de espruce pré-tratado em temperaturas altas usando mistura com uma xilanase termoestável

O procedimento conforme descrito no Exemplo 28 foi repetido com fibra de espruce explodida em vapor e lavada (impregnação com 3% peso/peso de SO₂ por 20 minutos, seguido por pré-tratamento com vapor a 215°C por 5 minutos com matéria seca de 25,9%) como substrato usando temperaturas de hidrólise de 45°C, 55°C e 60°C. As amostras foram tomadas da hidrólise após 24, 48 e 72 horas e tratadas conforme descrito acima. Os produtos de hidrólise foram quantificados usando o ensaio para reduzir os açúcares (Bemfeld, 1955), empregando glicose como padrão. Os resultados dos brancos do substrato foram subtraídos das amostras com enzimas, e a concentração dos produtos de hidrólise como açúcares de redução é apresentada na figura 12.

Os resultados mostram claramente o melhor desempenho da mistura das enzimas descritas aqui em comparação às enzimas de *Trichoderma* do estado da técnica. A 45°C a mistura de enzimas termofílicas mostrou hidrólise mais eficiente em comparação às enzimas *T. reesei*, evidentemente devido à melhor estabilidade em hidrólise de longo prazo. A 55°C a eficiência da mistura das enzimas descritas aqui ainda estava no mesmo nível em relação a 45°C, considerando-se que a mistura do estado da técnica foi ineficaz com o substrato usado nessa temperatura. A 60°C as enzimas termofílicas descritas aqui mostraram hidrólise diminuída embora a hidrólise

estivesse próxima ao mesmo nível de desempenho das enzimas do estado da técnica a 45°C.

Exemplo 30. Avaliação da inibição da glicose das β -glicosidases de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 e *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

Os filtrados de cultura produzidos pelas cepas de *Acremonium thermophilum* ALKO4245, *Chaetomium thermophilum* ALKO4261 e *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 são descritos no Exemplo 1. As atividades da β -glicosidase (medidas de acordo com Bailey and Linko, 1990) dessas preparações foram de 21,4 nkat/mL, 5,6 nkat/mL e 18,6 nkat/mL, respectivamente. Para comparação, enzimas comerciais Celluclast 1,5 L (β -glicosidase 534 nkat/mL) e Novozym 188 (β -glicosidase 5840 nkat/mL) foram também incluídas no experimento.

A fim de avaliar a sensibilidade das β -glicosidases diferentes na direção de inibição da glicose, o procedimento de ensaio de atividade padrão foi realizado na presença de concentrações diferentes de glicose. As soluções de substrato (p-nitrofeil- β -D-glicopiranosídeo) para o ensaio de atividade da β -glicosidase foram suplementados por glicose, de modo que a concentração na mistura de ensaio foi ajustada para os valores de 0 a 0,5 M. Exceto essa adição de glicose, o ensaio foi realizado usando o procedimento padrão (Bailey and Linko, 1990). As atividades na presença de concentrações variadas de glicose como uma porcentagem da atividade sem glicose são apresentadas na figura 13.

Os resultados mostram que β -glicosidases de *C. thermophilum* e *T. aurantiacus* foram menos afetados pela inibição de glicose que as β -glicosidases presentes nas enzimas comerciais: β -glicosidase derivada de *Aspergillus* em Novozym 188 ou β -glicosidase derivada de *Trichoderma* em Celluclast 1,5L. A enzima *A. thermophilum* mostrou comportamento comparável ao da enzima *T. reesei* de Celluclast. Especialmente a enzima *C. thermophilum* foi claramente menos afetada por alta concentração de glicose. Assim, esses resultados indicam que considerando-se a inibição de glicose o uso de novas β -glicosidases, especialmente de cepas *Acremonium*

thermophilum ALKO4242 e *Chaetomium thermophilum* ALKO4261, forneceria vantagens claras na hidrólise em condições industriais com alta concentração de glicose.

Exemplo 31. Atividade do papel filtro das misturas de enzima em temperaturas altas

5 A atividade do papel filtro das preparações de enzima foi medida de acordo com o método da IUPAC (1987) conforme descrito no procedimento, exceto que a reação da enzima foi realizada a temperaturas de 50°C a 70°C. A atividade de FPU calculada se baseia na quantidade de enzima
10 necessária para hidrolisar 4% do substrato de papel de filtro em 1 hora sob condições experimentais. A atividade de FPU foi considerada como representando a atividade de celulase total de uma preparação de enzima.

As misturas de enzima foram a MISTURA 2 preparada conforme descrito no Exemplo 27, a MISTURA 3 preparada conforme descrito no Ex-
15EMPLO 28 e MISTURA 4. A MISTURA 4 foi preparada por combinação das preparações de enzima descritas no Exemplo 27 como se segue (por 10 mL da mistura): preparação de CBH/Cel7, 7,84 mL, preparação de endoglicanase, 0,99 mL e preparação de β -glicosidase, 1,17 mL.

As misturas de enzima usadas como referência, representando
20 as misturas do estado da técnica foram:

"ENZIMAS A DE *T. REESEI*" preparadas de acordo com a preparação de "ENZIMAS DE *T. REESEI*" descrita no Exemplo 26.

"ENZIMAS B DE *T. REESEI*" que foram construídas combinando (por 10 mL), 8,05 mL de Econase CE (uma preparação comercial de celu-
25 lase de *T. reesei* da AB Enzymes Oy, Rajamaki, Finlândia) e 1,95 mL de Novozym 188 (da Novozymes A/S).

As atividades de FPU medidas para as preparações de enzima em temperaturas diferentes são apresentadas na figura 14, como as porcentagens de atividade sob condições padrão (IUPAC, 1987) (a 50°C).

30 Os resultados mostram claramente que as misturas da invenção mostram atividade de celulose total mais alta em temperaturas elevadas (60-70°C) quando comparada às misturas do estado da técnica, com base nas

enzimas de *Trichoderma* e *Aspergillus*.

Exemplo 32. Uso das novas beta-glicosidades na preparação de soforose

5 Uma mistura de hidrolisado de amido de alta concentração (Nutriose 74/968, Roquette) foi tratada com preparação de enzima enriquecida com β G-81/Cel3A de *Thermoascus aurantiacus* produzida conforme descrito no Exemplo 21, para obtenção de uma mistura de açúcar contendo quantidades apreciáveis de indutor de celulose (soforose) para superar a repressão da glicose.

10 A preparação de enzima enriquecida com Ta β G-81/Cel3A foi adicionada a uma solução de Nutriose a 70% (peso/peso) para uma concentração final de 1 g de proteína total/litro. O recipiente da mistura foi incubado em um banho de água a 65°C por 3 dias com agitação constante e usado como uma fonte de carbono em um meio de frasco agitado para duas cepas diferentes de *Trichoderma* (A47 e Rut-C30). O efeito do tratamento da enzima foi medido como uma atividade da endoglicanase formada durante uma cultivo de frasco de agitação de 7 dias. Como uma referência, os cultivos foram realizados nas mesmas condições com Nutriose não tratada como uma fonte de carbono. Um aumento superior a duas vezes nas atividades foi obtido nos cultivos de frasco de agitação realizados em um meio de Nutriose pré-tratado com Ta β G-81/Cel3A com as cepas testadas. Os resultados são mostrados na figura 15.

Lista de Organismos Depositados

Cepa	Plasmídeo contido	Autoridade depositária	Data do depósito	Nº do depósito
<i>Acremonium thermophilum</i> ALKO4245	-	CBS ⁽¹⁾	20 de setembro de 2004	CBS 116240
<i>Thermoascus aurantiacus</i> ALKO4242	-	CBS ⁽¹⁾	20 de setembro de 2004	CBS 116239
<i>Chaetomium thermophilum</i> ALKO4265	-	CBS ⁽²⁾	8 de novembro de 1995	CBS 730,95 ⁽⁴⁾

Cepa	Plasmídeo contido	Autoridade depositária	Data do depósito	Nº do depósito
<i>Escherichia coli</i>	pALK1635	DSMZ ⁽³⁾	16 de setembro de 2004	DSM 16723
<i>Escherichia coli</i>	pALK1642	DSMZ	16 de setembro de 2004	DSM 16727
<i>Escherichia coli</i>	pALK1646	DSMZ	16 de setembro de 2004	DSM 16728
<i>Escherichia coli</i>	pALK1861	DSMZ	16 de setembro de 2004	DSM 16729
<i>Escherichia coli</i>	pALK1715	DSMZ	16 de setembro de 2004	DSM 16724
<i>Escherichia coli</i>	pALK1723	DSMZ	16 de setembro de 2004	DSM 16725
<i>Escherichia coli</i>	pALK1725	DSMZ	16 de setembro de 2004	DSM 16726
<i>Escherichia coli</i>	pALK1904	DSMZ	13 de maio de 2005	DSM 17323
<i>Escherichia coli</i>	pALK1908	DSMZ	13 de maio de 2005	DSM 17324
<i>Escherichia coli</i>	pALK1925	DSMZ	13 de maio de 2005	DSM 17325
<i>Escherichia coli</i>	pALK1926	DSMZ	13 de maio de 2005	DSM 17326
<i>Escherichia coli</i>	pALK2001	DSMZ	18 de outubro de 2005	DSM 17667
<i>Escherichia coli</i>	pALK2010	DSMZ	18 de novembro de 2005	DSM 17729

(1) The Centralbureau Voor Schimmelcultures at Uppsalalaan 8, 3584 CT, Utrecht, Países Baixos

(2) The Centralbureau Voor Schimmelcultures at Oosterstraat 1, 3742 SK BAARN, Países Baixos

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

(4) [Após o término do período de depósito corrente, as amostras serão armazenadas de acordo com tratados de modo a tornar a cepa disponível além do tempo permitido pela patente]

10 Referências

Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.

Badger, P.C. (2002) Ethanol from cellulose: a general review. In Trends in new crops and new uses. J. Janick e a. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA, USA, pp. 17-21.

15

Bailey M. J. and K. M. H. Nevalainen (1981) Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with improved production of

solubilizing cellulase. *Enz Microbiol Technol.* 3:153-157.

Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K. (1992) Interlaboratory testing for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* 23:257-270.

- 5 Bailey, M. J. and Linko, M. (1990) Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation. *J. Biotechnol.* 16:57-66.

Bailey M. J. and Poutanen K. (1989) Production of xylanases by strains of *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:5-10.

- 10 Bailey M., Siika-aho M., Valkeajärvi A. and Penttilä M. (1993) Hydrolytic properties of two cellulases of *Trichoderma reesei* expressed in yeast. *Biotechnol. Appl. Biochem* 17:65-76.

Bendtsen J. D., Nielsen H., von Heijne G. and Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.

- 15 Bernfeld, B. (1955) Amylases, α e β . In: *Methods in Enzymology*, vol. 1, Eds. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Academic Press, New York, pp. 149-158.

Biely P., Vrsanska M., Tenkanen M., Kluepfel D. (1997) Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology* 57: 151-166.

- 20 Coen, D. M. (2001) The polymerase chain reaction. In: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., More, D. D., Seidman, J.G., Smith, K. and Struhl, K. (eds.) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, USA.

- 25 Gasteiger, E., Gattiker A., Hooghe c, Ivanyi I., Appel R. D. and Bairoch A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge e analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788.

Gellissen, G. (ed.) (2005) Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim, Alemanha.

- 30 Gill, S. C, and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319-326.

Gupta, R., E. Jung and S. Brunak. (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins, In preparation. www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/

- 5 Haakana H., Miettinen-Oinonen A., Joutsjoki V., Mantyla A., Suomi-
nen P, and Vehmaanperä J. (2004) Cloning of cellulase genes from *Melanocarpus albomyces* and their efficient expression in *Trichoderma reesei*. *Enz. Microbiol. Technol.* 34:159-167.

Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316.

- 10 Henrissat B. and Bairoch A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293:781-788.

Henrissat B. and Bairoch A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316:695-696

- 15 Henrissat B., Teeri T. T. and Warren R. A. J. (1998) A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell wall of plants. *FEBS Letters* 425: 352-354.

- Hong J., H. Tamaki, K. Yamamoto, and Kumagai H. (2003a) Cloning of a gene encoding a thermostable endo- β -1,4-galactanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Biotech. Letters* 25: 657-661.

- Hong J., Tamaki H., Yamamoto K. and Kumagai H. (2003b) Cloning of a gene encoding a thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 42-50.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268.

- Joutsjoki, V. V., Torkkeli T.K. and Nevalainen K. M. H. (1993) Transformation of *Trichoderma reesei* with the *Hormoconis resinae* glucoamylase P (gamP) gene: production of a heterologous glucoamylase by *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24: 223-228.

Karhunen T., Mäntylä A., Nevalainen K. M. H. and Suominen P.

- L. (1993) High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglycanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.
- Kurabi A., Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Markov A., Skomarovsky A., Gusakov A., Okunev O., Sinitsyn A., Gregg D. Xie D. and Saddler J. (2005) Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Fir by novel e commercial fungal cellulases. Appl. Biochem and Biotechn. Vol 121-124:219-229.
- Lever, M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem., 47:276-279.
- 10 Lo Leggio, L., Kalogiannis S., Bhat M. K., and Pickersgill R.W. (1999) High resolution structure and sequence of the *T. aurantiacus* xylanase I: implications for evolution of thermostability in familia 10 xylanases and enzymes with (beta) alpha-barrel architecture. Proteins 36(3):295-306.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951)
- 15 Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Needleman S. and Wunsch C. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. Journal of Molecular Biology 48, 443-453.
- 20 Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. and von Heijne G. (1997) Identification of prokaryotic and eykaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10: 1-6.
- Paloheimo M., Mäntylä A., KalMo J., and Suominen P. (2003) High- yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. Appl. Env. Microbiol. 69: 7073-7082.
- 25 Parry N., Beever D., Owen E., Nerinckx W. Claeysens M, Van Beeumen J. and Bhat M. (2002) Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglycanase purified from *Thermoascus aurantia-*
- 30 *cus*, Arch, of Biochem. and Biophys. 404: 243-253.
- Penttilä M., Nevalainen H., Ratt[omicronn] M., Salminen E. and Knowles J. (1987) A versatile transformation system for the cellulolytic fila-

mentous fungus *Trichoderma reesei*. Gene 61 :155-164.

Raeder U. and Broda P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1 : 17-20.

5 Rice P, Longden I and Bleasby A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends in Genetics 16:276-277.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

10 Sambrook J. and Russell D. W. (2001) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.

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

15 Sundberg, M., and Poutanen, K. (1991) Purification and properties of two acetylxyln esterases of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Appl. Bio-chem. 13:1-11.

Suurnäkki, A., Tenkanen M., Siika-aho, M., Niku-Paavola, M.-L., Viikari, L. and Buchert, J. (2000) *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. Cellulose 20 7: 189-209.

Tenkanen, M., Puls, J. and Poutanen, K (1992) Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microbiol. Technol. 14: 566-574.
Tomme, P. McRae, S., Wood, T. e claeysens, M. (1988) Chromatographic separation of cellulolytic enzymes. Methods in Enzymol. 160: 187-192.

25 Tuohy M., Walsh J., Murray P., Claeysens M., Cuffe M., Savage A. e coughan M. (2002) Kinetic parameters and mode of action of cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. Biochem. Biophys. Acta 1596: 366-380 (abstract).

30 Van Petegem e outros (2002) Atomic resolution structure of major endoglycanase from *Thermoascus aurantiacus*, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 296, pp. 161-166.

Van Tilbeurgh, H., Loontjies, F., de Bruyne, C. e claeysens, M. (1988) Fluorogenic e chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Methods Enzymol.* 160:45-59.

- 5 Wyman, CE. (2001) Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93:5-21.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Roal

<120> Tratamento de material celulósico e enzimas úteis para o mesmo

10 <130> 2051999

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3192

15 <212> DNA

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<220>

<221> CDS

<222> (1514)..(2122)

20 <223>

<220>

<221> íntron

<222> (2123)..(2187)

<223>

25 <220>

<221> CDS

<222> (2188)..(2949)

<223>

<400> 1

30 ctagaccttt atcctttcat ccgaccagac ttcccctttg accttggcgc cctgttgact 60

acctacctac ctaggtaggt aacgtcgtcg accctcttga atgacccctg tcacactgca 120

aacatccgaa acatacggca aaagatgatt gggcatggat gcaggagaca tcgaatgagg 180

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar material celulósico com celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosidase, caracterizado pelo fato de que a dita celobioidrolase compreende uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO: 2, 4, 6 ou 8, o dito método compreendendo contactar o dito material celulósico com a dita celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosidase.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a celobioidrolase é obtida de a partir de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a celobioidrolase é obtida de a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239, *Acremonium thermophilum* CBS 116240, ou *Chaetomium thermophilum* CBS 730.95.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as enzimas recombinantes são usadas em uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.
5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as enzimas recombinantes são produzidas em uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.
6. Método, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que compreende o emprego de uma celobioidrolase obtida de *Thermoascus aurantiacus* ou *Acremonium thermophilum* às quais um domínio de ligação de celulose foi anexado geneticamente.
7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação de celulose anexado é derivado de *Trichoderma reesei* ou *Chaetomium thermophilum*, e a proteína de fusão resultante compreende uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO: 28 ou 30.
8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a endoglicanase compreende uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO: 10, 12, 14 ou 16.
9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo

fato de que a endoglicanase é obtida de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a endoglicanase é obtida de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239, *Acremonium thermophilum* CBS 116240 ou *Chaetomium thermophilum* CBS 730.95.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a beta-glicosidase compreende uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO: 22, 24 ou 26.

10 12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a beta-glicosidase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum*, ou *Chaetomium thermophilum*.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a beta-glicosidase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239, *Acremonium thermophilum* CBS 116240, ou *Chaetomium thermophilum* CBS 730.95.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o material celulósico é material lignocelulósico.

15. Método, de acordo a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende tratamento do material lignocelulósico com uma enzima adicional xilanase, que consiste em uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO: 18 ou 20.

16. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a xilanase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* ou *Acremonium thermophilum*.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que a xilanase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239 ou de *Acremonium thermophilum* CBS 116240.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as enzimas são adicionadas ao material celulósico simultaneamente.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que as enzimas são adicionadas ao material celulósico sequencialmente.

20. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma das enzimas é codificada por um gene incluído em um microrganismo apresentando número de acesso DSM 16723, DSM 16728, DSM 16729, DSM 16727, DSM 17326, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16724, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o material celulósico é selecionado do grupo consistindo em palha de milho, gramínea do tipo "switchgrass" nativa da América do Norte, palha de cereais, bagaço de cana de açúcar e materiais derivados de madeira.

22. Preparação de enzima, caracterizada pelo fato de que compreende celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosidase, em que a dita celobioidrolase compreende uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO: 2, 4, 6 ou 8.

23. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a dita celobioidrolase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*.

24. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que a celobioidrolase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239, *Acremonium thermophilum* CBS 116240 ou *Chaetomium thermophilum* CBS 730.95.

25. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que as enzimas são enzimas recombinantes, preferivelmente produzidas em uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

26. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizada pelo fato de que as enzimas são produzidas em uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

27. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que compreende uma celobioidrolase obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* à qual um domínio de ligação de celulose foi

anexado geneticamente.

28. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o domínio de ligação de celulose anexado é derivado a partir de *Trichoderma reesei* ou *Chaetomium thermophilum*, e a proteína de fusão resultante compreende uma sequência de aminoácidos apresentado SEQ ID NO: 28 ou 30.

29. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a endoglicanase compreende uma sequência de aminoácidos apresentando SEQ ID NO: 10, 12, 14 ou 16.

30. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a endoglicanase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*.

31. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizada pelo fato de que a endoglicanase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239, *Acremonium thermophilum* CBS 116240 ou *Chaetomium thermophilum* CBS 730.95.

31. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a beta-glicosidase compreende uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO: 22, 24 ou 26.

32. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que a beta-glicosidase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum*, ou *Chaetomium thermophilum*.

33. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizada pelo fato de que a beta-glicosidase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239, *Acremonium thermophilum* CBS 116240 ou *Chaetomium thermophilum* CBS 730.95.

34. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que compreende uma enzima adicional xilanase, que consiste em uma sequência de aminoácidos apresentando SEQ ID NO: 18 ou 20.

35. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 34, ca-

racterizada pelo fato de que a xilanase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* ou *Acremonium thermophilum*.

36. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 34 ou 35, caracterizada pelo fato de que a xilanase é obtida a partir de *Thermoascus aurantiacus* CBS 116239 ou *Acremonium thermophilum* CBS 116240.

37. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que uma das enzimas é codificada por um gene incluído em um microrganismo apresentando número de acesso DSM 16723, 5 DSM 16728, DSM 16729, DSM 16727, DSM 17326, DSM 17324, DSM 17323, 10 DSM 17729, DSM 16724, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

38. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que está na forma de meio de cultura gasto, pó, grânulos ou líquido.

39. Uso de uma preparação de enzima, como definida em qualquer uma das reivindicações 22 a 38, caracterizado pelo fato de que é para degradação de material celulósico.

40. Uso, de acordo com reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o material celulósico é selecionado a partir do grupo consistindo em 20 palha de milho, gramínea do tipo switchgrass nativa da América do Norte, palha de cereais, bagaço de cana de açúcar e materiais derivados de madeira.

41. Uso do método, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que é em um processo para preparação de etanol a partir de material celulósico.

42. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende como uma sequência heteróloga um polinucleotídeo, de SEQ ID NO: 3, 5, 11, 13, 15, 19, 21, 23, ou 25.

43. Vetor, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que é capaz de expressar um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentando SEQ ID NO: 4, 6, 12, 14, 16, 20, 22, 24 ou 26.

44. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que é uma célula de fungo que compreende o vetor, como definido na reivindicação 42.

45. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que é capaz de expressar o polipeptídeo codificado pela
5 sequência de polinucleotídeo heteróloga.

46. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que é uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

47. Cepa de *Escherichia coli*, caracterizada pelo fato de que possui número de acesso DSM 16728, DSM 16729, DSM 17324, DSM 17323,
10 DSM 17729, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

48. Preparação de enzima, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo apresentando SEQ ID NO: 4, 6, 12, 14, 16, 20, 22, 24 ou 26.

49. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de que está na forma de meio de cultura gasto, pó, grânulos ou líquido.
15

50. Preparação de enzima, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, caracterizada pelo fato de que compreende atividade de celobioidrolase, endoglicanase, beta-glicosidase, e opcionalmente de xilanase.

51. Uso de um polipeptídeo apresentando SEQ ID NO: 4, 6, 12, 14, 16, 20, 22, 24 ou 26, ou uma preparação de enzima, como definida na reivindicação 48, caracterizada pelo fato de que é na indústria de combustíveis, têxteis, detergentes, polpa e papel, alimentos, suplementos ou bebidas.
20

52. Uso, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a enzima é empregada no tratamento de polpa kraft, polpa mecânica ou papel reciclado.
25

53. Uso, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a preparação de enzima é meio de cultura gasto.

54. Método para preparar um polipeptídeo, apresentando atividade celulósica e:
30

a) compreendendo uma sequência de aminoácido apresentando SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:16,

SEQ ID NO: 20, SEQ ID N°:22 ou 24, ou SEQ ID N°:26;

caracterizado pelo fato de que compreende transformação de uma célula hospedeira com um vetor codificando o dito polipeptídeo, e cultivo da célula hospedeira sob condições que permitem expressão do dito polipeptídeo, e opcionalmente recuperação e purificação do polipeptídeo produzido.

55. Método para tratar material celulósico, caracterizado pelo fato de que é com um meio de cultura gasto de um microrganismo capaz de produzir um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido apresentando

SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 ou SEQ ID NO:24, ou SEQ ID NO: 26;

o dito método compreendendo reação do material celulósico com o meio de cultura gasto para obtenção de material celulósico hidrolisado.