República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0812276-8 B1

(22) Data do Depósito: 30/05/2008

(45) Data de Concessão: 25/06/2024

(54) Título: MÉTODOS PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE UM POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE CELULOLÍTICA INTENSIFICADORA, PARA DEGRADAR OU CONVERTER UM MATERIAL CONTENDO CELULOSE, E PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C12N 9/42; C12P 7/06.

(30) Prioridade Unionista: 31/05/2007 US 60/941243.

(73) Titular(es): NOVOZYMES, INC..

(72) Inventor(es): KEITH MCFARLAND; PAUL HARRIS.

(86) Pedido PCT: PCT US2008065360 de 30/05/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/151043 de 11/12/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/11/2009

(57) Resumo: MÉTODOS PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE UM POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE CELULOLÍTICA INTENSIFICADORA, PARA DEGRADAR OU CONVERTER UM MATERIAL CONTENDO CELULOSE, E PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, COMPOSIÇÃO. A presente invenção refere-se aos métodos de aumentar a atividade de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, compreendendo: adicionar um cátion de metal divalente ativador solúvel em uma composição compreendendo o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, sendo que a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão de um material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel. A presente invenção também se refere às composições, aos métodos para degradar ou converter um material contendo celulose, e aos métodos para produzir um produto de fermentação.

“MÉTODOS PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE UM POLIPEPTÍDEO TENDO ATIVIDADE CELULOLÍTICA INTENSIFICADORA, PARA DEGRADAR OU CONVERTER UM MATERIAL CONTENDO CELULOSE, E PARA PRODUZIR UM PRODUTO DE FERMENTAÇÃO, E, COMPOSIÇÃO.”

Referência à Listagem de Sequência

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

Referência ao depósito de material biológico

[002] Este pedido contém uma referência ao depósito de material biológico, cujo depósito É aqui incorporado como referência.

Fundamentos da Invenção

Campo da invenção

[003] A presente invenção refere-se aos métodos e às composições para aumentar a atividade de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora.

Descrição da arte relacionada

[004] Celulose é um polímero de açúcar simples glicose covalentemente ligada por ligações beta-1,4. Muitos microorganismos produzem enzimas que hidrolisam glicanas beta-ligados. Estas enzimas incluem endoglicanases, celobioidrolases, e beta-glicosidases. Endoglicanases digerem o polímero de celulose em localizações aleatórias, abrindo-o para atacar por celobioidrolases. Celobioidrolases sequencialmente liberam moléculas de celobiose das extremidades do polímero de celulose. Celobiose é um dímero de glicose beta-1,4-ligado solúvel em água. Beta-glicosidases hidrolisam celobiose em glicose.

[005] A conversão de matérias-primas celulósicas em etanol tem as vantagens da pronta disponibilidade de quantidades grandes de matéria-prima,

a desejabilidade de evitação de queima de materiais ou de seus rejeitos em aterro de lixo, e a limpeza do combustível etanol. Madeira, resíduos agrícolas, plantações herbáceas, e resíduos sólidos municipais têm sido considerados como matérias-primas para produção de etanol. Estes materiais principalmente consistem de celulose, hemicelulose, e lignina. Uma vez convertida a celulose em glicose, a glicose é facilmente fermentada por leveduras em etanol.

[006] WO 2005/074647 revela polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora e seus polinucleotídeos de *Thielavia terrestris*. WO 2005/074656 revela um polipeptídeo isolado tendo atividade celulolítica intensificadora e um seu polinucleotídeo de *Thermoascus aurantiacus*. Pedido U.S. Publicado de Número Serial 2007/0077630 revela um polipeptídeo isolado tendo atividade celulolítica intensificadora e um seu polinucleotídeo de *Trichoderma reesei*.

[007] Seria uma vantagem na arte melhorar a atividade de polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora.

[008] A presente invenção refere-se aos métodos e às composições para aumentar a atividade de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora.

Sumário da Invenção

[009] A presente invenção refere-se aos métodos para aumentar a atividade de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, compreendendo: adicionar um cátion de metal divalente ativador solúvel em uma composição compreendendo o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do

material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

[0010] A presente invenção também se refere aos métodos para degradar ou converter um material contendo celulose, compreendendo: tratar o material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma composição de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM.

[0011] A presente invenção também se refere aos métodos para produzir um produto de fermentação, compreendendo: (a) sacarificar um material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma composição de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM; (b) fermentar o material contendo celulose sacarificado de etapa (a) com um ou mais microorganismos fermentadores para produzir o produto de fermentação; e (c) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[0012] A presente invenção também se refere às composições compreendendo um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta

a degradação ou conversão do material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

[0013] A presente invenção também se refere às composições de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose pelas composições de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

Descrição Breve das Figuras

[0014] Figura 1 mostra um mapa de restrição de pMJ04.

[0015] Figura 2 mostra um mapa de restrição de pCaHj527.

[0016] Figura 3 mostra um mapa de restrição de pMT2188.

[0017] Figura 4 mostra um mapa de restrição de pCaHj568.

[0018] Figura 5 mostra um mapa de restrição de pMJ05.

[0019] Figura 6 mostra um mapa de restrição de pSMai130.

[0020] Figura 7 mostra a sequência de DNA e a sequência de aminoácidos de uma sequência de sinal nativa de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NOs: 57 e 58).

[0021] Figura 8 mostra a sequência de DNA e a sequência de aminoácidos de uma sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* (SEQ ID NOs: 61 e 62).

[0022] Figura 9 mostra um mapa de restrição de pSMai135.

[0023] Figura 10 mostra um mapa de restrição de pSMai140.

[0024] Figura 11 mostra um mapa de restrição de pSaMe-F1.

[0025] Figuras 12A, 12B, 12C, e 12D mostram a sequência de DNA e a sequência de aminoácidos deduzida de uma proteína de fusão BG de variante de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NOs: 25 e 26, respectivamente).

[0026] Figura 13 mostra um mapa de restrição de pSaMe-FX.

[0027] Figures 14A, 14B, 14C, e 14D mostram a sequência de DNA e a sequência de aminoácidos deduzida da proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NOs: 27 e 28, respectivamente).

[0028] Figure 15 mostra um mapa de restrição de pAlLo47.

[0029] Figure 16 mostra a conversão de celulose em palhada de milho pré-tratada em glicose e celobiose com adição de vários íons de metais divalentes solúveis para uma concentração final de 10 mM em misturas incluindo um caldo de fermentação que compreende enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei*, uma proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*, e um polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus* GH61A tendo atividade celulolítica intensificadora.

[0030] Figure 17 mostra a conversão de celulose em palhada de milho pré-tratada em glicose e celobiose com adição de vários íons de metais divalentes para uma concentração final de 1 mM em misturas incluindo um caldo de fermentação que compreende enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* e uma beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* com e sem adição de um polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus* GH61A tendo atividade celulolítica intensificadora.

[0031] Figure 18 mostra a conversão de celulose em palhada de milho pré-tratada em glicose e celobiose com adição de $MgCl_2$ e $MnSO_4$ para uma concentração final de 0,0001 a 10 mM em misturas incluindo caldo de fermentação dessalinizado ou não-dessalinizado que compreende enzimas

celulolíticas de *Trichoderma reesei*, uma proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*, e um polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus* GH61A tendo atividade celulolítica intensificadora.

Definições

[0032] Atividade celulolítica intensificadora: O termo "atividade celulolítica intensificadora" é aqui definido como uma atividade biológica que intensifica a hidrólise de um material contendo celulose por proteínas tendo atividade celulolítica. Para propósitos da presente invenção, atividade celulolítica intensificadora é determinada por medição do aumento em açúcares redutores ou do aumento de celobiose e glicose totais da hidrólise de um material contendo celulose por proteína celulolítica sob as seguintes condições: 1-50 mg de proteína total contendo 80-99,5% p/p de proteína celulolítica/g de celulose em PCS e 0,5-20% p/p de proteína de atividade celulolítica intensificadora por 1-7 dias a 50°C comparada com uma hidrólise de controle com carga de proteína total igual sem atividade celulolítica intensificadora (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulose em PCS). Em um aspecto preferido, uma mistura de CELLUCLAST® 1,5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) na presença de 3% de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (recombinantemente produzida em *Aspergillus oryzae* de acordo com WO 02/095014) ou 3% de beta-glicosidase de *Aspergillus fumigatus* (recombinantemente produzida em *Aspergillus oryzae* de acordo com Exemplo 22 de WO 02/095014) de carga de proteína celulase é usada como um padrão da atividade celulolítica.

[0033] Os polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora têm pelo menos 20%, preferivelmente pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 100% da

atividade celulolítica intensificadora do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, ou 14.

[0034] Os polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora intensificam a hidrólise de um material contendo celulose catalisada por proteínas tendo atividade celulolítica pela redução da quantidade de enzima celulolítica exigida para alcançar o mesmo grau de hidrólise preferivelmente pelo menos 0,1-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,2-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,3-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,4-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,5-vez, mais preferivelmente pelo menos 1-vez, mais preferivelmente pelo menos 3-vezes, mais preferivelmente pelo menos 4-vezes, mais preferivelmente pelo menos 5-vezes, mais preferivelmente pelo menos 10-vezes, mais preferivelmente pelo menos 20-vezes, ainda mais preferivelmente pelo menos 30-vezes, muito mais preferivelmente pelo menos 50-vezes, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 100-vezes.

[0035] Atividade celulolítica: O termo "atividade celulolítica" é aqui definido como atividade de celulase (*e.g.*, endoglicanase(s), celobioidrolase(s), beta-glicosidase(s), ou suas combinações) que hidrolisa um material contendo celulose. Proteína celulolítica pode hidrolisar ou hidrolisa carbóxi-metil-celulose (CMC), diminuindo deste modo a viscosidade da mistura de incubação. A redução resultante em viscosidade pode ser determinada por um viscosímetro de vibração (*e.g.*, MIVI 3000 de Sofraser, França). Determinação de atividade de celulase, medida em termos de Unidade de Viscosidade de Celulase (CEVU), quantifica a quantidade de atividade catalítica presente em uma amostra pela medição da capacidade da amostra em reduzir a viscosidade de carbóxi-metil-celulose (CMC). O ensaio é realizado na temperatura e no pH adequados para a proteína celulolítica e o substrato.

[0036] Para propósitos da presente invenção, atividade celulolítica é

determinada pela medição do aumento em hidrólise de um material contendo celulose por uma composição celulolítica sob as seguintes condições: 1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulose em PCS por 1-7 dias a 50ºC comparada com uma hidrólise de controle sem adição de proteína celulolítica.

[0037] Endoglicanase: O termo "endoglicanase" é aqui definido como uma endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glicana-4-glicanaidrolase (E.C. No. 3,2,1,4), que catalisa endoidrolase de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose, derivados de celulose (tais como carbóxi-metil-celulose e hidróxi-etil-celulose), liquenina, ligações beta-1,4 em beta-1,3-glicanas mistos tais como beta-D-glicanas ou xiloglicanas em cereal, e outro material de planta contendo componentes celulósicos. Para propósitos da presente invenção, atividade de endoglicanase é determinada usando hidrólise de carbóxi-metil-celulose (CMC) de acordo com o procedimento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268.

[0038] Celobioidrolase: O termo "celobioidrolase" é aqui definido como uma 1,4-beta-D-glicana-celobioidrolase (E.C. 3,2,1,91), que catalisa a hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídicas em celulose, celooligossacarídeos, ou de qualquer polímero contendo glicose beta-1,4-ligada, liberando celobiose das extremidades redutoras ou não-redutoras da cadeia. Para propósitos da presente invenção, atividade de celobioidrolase é determinada de acordo com os procedimentos descritos por Lever *et al.*, 1972, *Anal. Biochem.* 47: 273-279 e por van Tilbeurgh *et al.*, 1982, *FEBS Letters* 149: 152-156; van Tilbeurgh e Claeyssens, 1985, *FEBS Letters* 187: 283-288. Na presente invenção, o método de Lever *et al.* foi utilizado para avaliar a hidrólise de celulose em foragem de milho, enquanto que o método de van Tilbeurgh *et al.* foi usado para determinar a atividade de celobioidrolase sobre um derivado de dissacarídeo fluorescente.

[0039] Beta-glicosidase: O termo "beta-glicosidase" é aqui definido como uma beta-D-glicosídeo-glicoidrolase (E.C. 3,2,1,21), que catalisa a

hidrólise de resíduos de beta-D-glicose não-redutores terminais com a liberação de beta-D-glicose. Para os propósitos da presente invenção, atividade de beta-glicosidase é determinada de acordo com o procedimento básico descrito por Venturi *et al.*, 2002, *J. Basic Microbiol.* 42: 55-66, exceto que condições diferentes foram utilizadas como aqui descrito. Uma unidade de atividade de beta-glicosidase é definida como 1,0 µmol de p-nitro-fenol produzido por minuto a 50°C, pH 5 a partir de 4 mM p-nitro-fenil-beta-D-glicopiranosídeo como substrato em citrato de sódio 100 mM, TWEEN® 20 0,01%.

[0040] Glicosídeo hidrolase de Família 7, 12, 45, ou 61: O termo “Glicosídeo hidrolase de Família 7” ou “Família GH7”, “Glicosídeo hidrolase de Família 12” ou “Família GH12”, “Glicosídeo hidrolase de Família 45” ou “Família GH45”, e “Glicosídeo hidrolase de Família 61” ou “Família GH61” é aqui definido como um polipeptídeo caindo dentro das Família 7, Família 12, Família 45, e Família 61 de glicosídeo hidrolase, respectivamente, de acordo com Henrissat B., 1991,"A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities", *Biochem. J.* 280: 309-316, e Henrissat B., e Bairoch A., 1996, "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases", *Biochem. J.* 316: 695-696. Presentemente, Henrissat lista a família GH61 como não classificada indicando que propriedades tais como mecanismo, nucleófilo/base catalítico(a), doadores de próton catalíticos, e estrutura 3-D não são conhecidos para polipeptídeos pertencendo a esta família. Uma proteína GH7, GH12, ou GH45 também é aqui chamada de proteína CEL7, CEL12, ou CEL45, respectivamente.

[0041] Material contendo celulose: O polissacarídeo predominante na parede celular primária de biomassa é celulose, o segundo mais abundante é hemi-celulose, e o terceiro é pectina. A parede celular secundária, produzida após a célula ter parado de crescer, também contém polissacarídeos e é fortalecida por lignina polimérica covalentemente reticulada em hemicelulose.

Celulose é um homopolímero de celobiose anidra e portanto um beta-(1-4)-D-glicana linear, enquanto que hemiceluloses incluem uma variedade de compostos, tais como xilanas, xiloglicanas, arabinoglicanas, e mananas em estruturas ramificadas complexas com um espectro de substituintes Embora geralmente polimórfica, celulose é encontrada em tecido de planta principalmente como uma matriz cristalina insolúvel de cadeias de glicana paralelas. Hemiceluloses costumeiramente ligam-se por hidrogênio em celulose, bem como em outras hemiceluloses, o que ajuda a estabilizar a matriz de parede celular.

[0042] O material contendo celulose pode ser qualquer material contendo celulose. Celulose é geralmente encontrada, por exemplo, nos troncos, folhas, cascas, folhelhos, e sabugos de plantas ou folhas, ramos, e madeira de árvores. O material contendo celulose pode ser, mas não é limitado a, material herbáceo, resíduos agrícolas, resíduos de silvicultura, resíduos sólidos municipais, papel residual, e polpa e resíduos de fábrica de papel. O material contendo celulose pode ser de qualquer tipo de biomassa incluindo, mas não limitado a, recursos de madeira, resíduo sólido municipal, papel residual, plantações, e resíduos de plantação (veja, por exemplo, Wiselogel *et al.*, 1995, em Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp,105-118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, *Bioresource Technology* 50: 3-16; Lynd, 1990, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24/25: 695-719; Mosier *et al.*, 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, em *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, T. Scheper, editor geral, Volume 65, pp,23-40, Springer-Verlag, New York). É entendido aqui que o material contendo celulose está preferivelmente na forma de lignocelulose, *e.g.*, um material de parede celular de planta contendo lignina, celulose, e hemicelulose em uma matriz mista.

[0043] Em um aspecto preferido, o material contendo celulose é

palhada de milho. Em outro aspecto preferido, o material contendo celulose é fibra de milho. Em outro aspecto preferido, o material contendo celulose é sabugos de milho. Em outro aspecto preferido, o material contendo celulose é *switch grass*. Em outro aspecto preferido, o material contendo celulose é palha de arroz. Em outro aspecto preferido, o material contendo celulose é papel e resíduo de processamento de polpa. Em outro aspecto preferido, o material contendo celulose é plantas herbáceas ou lenhosas. Em outro aspecto preferido, o material contendo celulose é bagaço.

[0044] O material contendo celulose pode ser usado como tal ou pode ser submetido ao pré-tratamento, usando métodos convencionais conhecidos na arte. Por exemplo, técnicas de pré-tratamento físico podem incluir vários tipos de moagem, irradiação, explosão com vapor/vaporização, e hidrotermólise; técnicas de pré-tratamento químico podem incluir solvente ácido diluído, alcalino, orgânico, amônia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono, e hidrotermólise controlada por pH; e técnicas de pré-tratamento biológico podem envolver aplicação de microorganismos solubilizadores de lignina (veja, por exemplo, Hsu, T.-A., 1996, "Pretreatment of biomass", em *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., e Singh, A., 1993, "Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass", *Adv. Appl. Microbiol*. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, "Pretreating lignocellulosic biomass: a review", em *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Himmel, M. E., Baker, J. O., e Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., e Tsao, G. T., 1999, "Ethanol production from renewable resources", em *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemanha, 65: 207-241; Olsson, L., e Hahn-Hagerdal, B., 1996, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for

ethanol production", *Enz. Microb. Tech*. 18: 312-331; e Vallander, L., e Eriksson, K.-E. L., 1990, "Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art", *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol*. 42: 63-95).

[0045] Palhada de milho pré-tratada: O termo "PCS" ou "palhada de milho pré-tratada" é aqui definido como um material contendo celulose derivado de palhada de milho pelo tratamento com calor e ácido diluído. Para os propósitos da presente invenção, PCS é feita pelo método aqui descrito em Exemplo 20, ou suas variações em tempo, temperatura e quantidade de ácido.

[0046] Polipeptídeo isolado: O termo "polipeptídeo isolado" como aqui usado refere-se a um polipeptídeo que é isolado de uma fonte. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é pelo menos 1% puro, preferivelmente pelo menos 5% puro, mais preferivelmente pelo menos 10% puro, mais preferivelmente pelo menos 20% puro, mais preferivelmente pelo menos 40% puro, mais preferivelmente pelo menos 60% puro, ainda mais preferivelmente pelo menos 80% puro, e muito mais preferivelmente pelo menos 90% puro, conforme determinado por SDS-PAGE.

[0047] Polipeptídeo substancialmente puro: O termo "polipeptídeo substancialmente puro" denota aqui uma preparação de polipeptídeo que contém no máximo 10%, preferivelmente no máximo 8%, mais preferivelmente no máximo 6%, mais preferivelmente no máximo 5%, mais preferivelmente no máximo 4%, mais preferivelmente no máximo 3%, ainda mais preferivelmente no máximo 2%, muito mais preferivelmente no máximo 1%, e ainda muito mais preferivelmente no máximo 0,5% em peso de outro material de polipeptídeo com o qual está nativa ou recombinantemente associado. Portanto, é preferido que o polipeptídeo substancialmente puro seja pelo menos 92% puro, preferivelmente pelo menos 94% puro, mais preferivelmente pelo menos 95% puro, mais preferivelmente pelo menos 96% puro, mais preferivelmente pelo menos 96% puro, mais preferivelmente pelo menos 97% puro, mais preferivelmente pelo menos 98% puro, ainda mais

preferivelmente pelo menos 99%, muito mais preferivelmente pelo menos 99,5% puro, e ainda muito mais preferivelmente 100% puro em peso do material de polipeptídeo total presente na preparação. Os polipeptídeos da presente invenção estão preferivelmente em uma forma substancialmente pura, *i.e.*, que a preparação de polipeptídeo está essencialmente livre de outro material de polipeptídeo com o qual está nativa ou recombinantemente associado. Isto pode ser realizado, por exemplo, por preparação do polipeptídeo por métodos recombinantes bem conhecidos ou por métodos de purificação clássicos.

[0048] Polipeptídeo maduro: O termo "polipeptídeo maduro" é aqui definido como um polipeptídeo tendo atividade biológica, *e.g.*, atividade de enzima, que está em sua forma final após tradução e quaisquer modificações de pós-tradução, tais como processamento N-terminal, truncamento C-terminal, glicosilação, fosforilação, etc.

[0049] Sequência codificadora de polipeptídeo maduro: O termo "sequência codificadora de polipeptídeo maduro" é aqui definido como uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo maduro tendo atividade biológica.

[0050] Identidade: A relação entre duas sequências de aminoácidos ou entre duas sequências de nucleotídeos é descrita pelo parâmetro "identidade".

[0051] Para os propósitos da presente invenção, o grau de identidade entre duas sequências de aminoácidos é determinado usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) como implementado no programa de Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends in Genetics* 16: 276-277), preferivelmente versão 3.0.0 ou posterior. Os parâmetros opcionais usados são penalidade de abertura de lacuna de 10, penalidade de extensão de lacuna de 0,5, e a matriz de substituição EBLOSUM62 (EMBOSS versão de BLOSUM62). O resultado da "identidade

mais longa" rotulada por Needle (obtida usando a opção –nobrief) é usado como a identidade percentual e é calculado como segue:

(Resíduos Idênticos x 100)/(Comprimento de Alinhamento – Número Total de Lacunas em Alinhamento)

[0052] Para os propósitos da presente invenção, o grau de identidade entre duas sequências de desoxirribonucleotídeos é determinado usando o algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman e Wunsch, 1970, *supra*) como implementado no programa de Needle do pacote EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferivelmente versão 3.0.0 ou posterior. Os parâmetros opcionais usados são penalidade de abertura de lacuna de 10, penalidade de extensão de lacuna de 0,5, e a matriz de substituição EDNAFULL (EMBOSS versão de NCBI NUC4.4). O resultado da "identidade mais longa" rotulada por Needle (obtida usando a opção –nobrief) é usado como a identidade percentual e é calculado como segue:

(Desoxirribonucleotídeos Idênticos x 100)/(Comprimento de Alinhamento – Número Total de Lacunas em Alinhamento)

[0053] Sequência homóloga: O termo "sequência homóloga" é aqui definido como sequências com um valor E (ou escore de expectativa) de menor do que 0,001 usando os algoritmos blastp (para banco de dados de proteínas) ou tblastn (para bancos de dados de ácidos nucleicos) com a matriz BLOSUM62, tamanho de palavra 3, custo de existência de lacuna 11, custo de extensão de lacuna 1, sem filtração de complexidade baixa, e uma sequência de proteína madura como indagação. Veja Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

[0054] Fragmento de polipeptídeo: O termo "fragmento de polipeptídeo" é aqui definido como um polipeptídeo tendo um ou mais (vários) aminoácidos deletados da terminação amino e/ou carboxila do polipeptídeo maduro ou uma sequência homóloga do mesmo, sendo que o

fragmento tem atividade igual à de seu polipeptídeo maduro.

[0055] Subsequência: O termo "subsequência" é aqui definido como uma sequência de nucleotídeos tendo um ou mais (vários) nucleotídeos deletados da extremidade 5' e/ou 3' da sequência codificadora de polipeptídeo maduro ou uma sua sequência homóloga, sendo que a subsequência codifica um fragmento de polipeptídeo tendo atividade igual à de seu polipeptídeo maduro.

[0056] Variante alélica: O termo "variante alélica" denota aqui quaisquer duas ou mais formas alternativas de um gene ocupando o mesmo locus cromossômico. Variação alélica decorre naturalmente através de mutação, e pode resultar em polimorfismo dentro de populações. Mutações de gene podem ser silenciosas (sem mudança no polipeptídeo codificado) ou podem codificar polipeptídeos tendo sequências de aminoácidos alteradas. Uma variante alélica de um polipeptídeo é um polipeptídeo codificado por uma variante alélica de um gene.

[0057] Polinucleotídeo isolado: O termo "polinucleotídeo isolado" como aqui usado refere-se a um polinucleotídeo que é isolado de uma fonte. Em um aspecto preferido, o polinucleotídeo é pelo menos 1% puro, preferivelmente pelo menos 5% puro, mais preferivelmente pelo menos 10% puro, mais preferivelmente pelo menos 20% puro, mais preferivelmente pelo menos 40% puro, mais preferivelmente pelo menos 60% puro, ainda mais preferivelmente pelo menos 80% puro, e muito mais preferivelmente pelo menos 90% puro, conforme determinado por eletroforese em agarose.

[0058] Polinucleotídeo substancialmente puro: O termo "polinucleotídeo substancialmente puro" como aqui usado refere-se a uma preparação de polinucleotídeo livre de outros nucleotídeos estranhos ou indesejados e em uma forma adequada para uso dentro de sistemas de produção geneticamente engenhados. Assim, um polinucleotídeo substancialmente puro contém no máximo 10%, preferivelmente no máximo

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

[0059] cDNA: O termo "cDNA" é aqui definido como uma molécula de DNA que pode ser preparada por transcrição reversa a partir de uma molécula de mRNA, editorada, madura obtida de uma célula eucariótica. cDNA é faltante de sequências de intron que estão costumeiramente presentes no DNA genômico correspondente. O transcrito de RNA primário, inicial é um precursor para mRNA que é processado através de uma série de etapas antes de aparecer como mRNA editorado maduro. Estas etapas incluem a remoção de sequências de intron por um processo chamado emenda. cDNA derivado de mRNA é portanto faltante de quaisquer sequências de intron.

[0060] Construto de ácido nucleico: O termo "construto de ácido nucleico" como aqui usado refere-se a uma molécula de ácido nucleico, de fita quer dupla quer única, que é isolada de um gene naturalmente ocorrente ou que é modificada para conter segmentos de ácidos nucleicos em uma maneira que de outro modo não existiria na natureza ou que é sintética. O termo construto de ácido nucleico é sinônimo do termo "cassete de expressão" quando o construto de ácido nucleico contém as sequências de controle exigidas para expressão de uma sequência codificadora da presente invenção.

[0061] Sequência de controle: O termo "sequências de controle" é aqui definido para incluir todos os componentes necessários para a expressão de um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção. Cada sequência de controle pode ser nativa ou estranha à sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo ou nativa ou estranha entre elas. Tais sequências de controle incluem, mas não são limitadas a, uma sequência líder, sequência de poliadenilação, sequência de propeptídeo, promotor, sequência de peptídeo de sinal, e terminador de transcrição. No mínimo, as sequências de controle incluem um promotor, e sinais de terminação de transcrição e de tradução. As sequências de controle podem ser fornecidas com linkers para o propósito de introduzur sítios de restrição específicos facilitando ligação das sequências de controle com a região codificadora da sequência de nucleotídeos codificadora de um polipeptídeo.

[0062] Operacionalmente ligado: O termo "operacionalmente ligado" denota aqui uma configuração na qual a sequência de controle está posicionada em uma posição apropriada relativa à sequência codificadora da sequência de polinucleotídeo de tal modo que a sequência de controle dirige a expressão da sequência codificadora de um polipeptídeo.

[0063] Sequência codificadora: Quando aqui usado o termo "sequência codificadora" significa uma sequência de nucleotídeos, que diretamente especifica a sequência de aminoácidos de seu produto de

proteína. Os limites da sequência codificadora são geralmente determinados por uma matriz de leitura aberta, que costumeiramente inicia com o códon de iniciação ATG ou códons de iniciação alternativos tais como GTG e TTG e termina com um códon de terminação tal como TAA, TAG, e TGA. A sequência codificadora pode ser um DNA, cDNA, sequência de nucleotídeos sintética, ou recombinante.

[0064] Expressão: O termo "expressão" inclui qualquer etapa envolvida na produção do polipeptídeo incluindo, mas não limitado a, transcrição, modificação pós-transcricional, tradução, modificação de pós-tradução, e secreção.

[0065] Vetor de expressão: O termo "vetor de expressão" é aqui definido como uma molécula de DNA linear ou circular DNA que compreende um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo da presente invenção e está operacionalmente ligado em nucleotídeos adicionais que proporcionam sua expressão.

[0066] Célula hospedeira: O termo "célula hospedeira", como aqui usado, inclui qualquer tipo de célula que é suscetível à transformação, transfecção, transdução, e semelhante com um construto de ácido nucleico ou vetor de expressão compreendendo um polinucleotídeo.

[0067] Modificação: O termo "modificação" significa aqui qualquer modificação química de um polipeptídeo maduro ou uma sequência homóloga do mesmo; bem como manipulação genética do DNA codificador de um tal polipeptídeo. A modificação pode ser uma substituição, uma deleção e/ou uma inserção de um ou mais (vários) aminoácidos bem como reposições de uma ou mais (várias) cadeias laterais de aminoácido.

[0068] Variante artificial: Quando aqui usado, o termo "variante artificial" significa um polipeptídeo produzido por um organismo expressando uma sequência de nucleotídeos modificada da sequência codificadora de polipeptídeo maduro ou uma sua sequência homóloga. A sequência de

nucleotídeos modificada é obtida através de intervenção humana por modificação da sequência de polinucleotídeo ou de uma sua sequência homóloga.

Descrição Detalhada da Invenção

[0069] A presente invenção refere-se aos métodos para aumentar a atividade de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, compreendendo: adicionar um cátion de metal divalente ativador solúvel em uma composição compreendendo o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

[0070] A presente invenção também se refere aos métodos para degradar ou converter um material contendo celulose, compreendendo: tratar o material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma composição de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM.

[0071] A presente invenção também se refere aos métodos para produzir um produto de fermentação, compreendendo: (a) sacarificar um material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma composição de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de

metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM; (b) fermentar o material contendo celulose sacarificado de etapa (a) com um ou mais microorganismos fermentadores para produzir o produto de fermentação; e (c) recuperar o produto de fermentação da fermentação.

[0072] A presente invenção também se refere às composições compreendendo um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

[0073] A presente invenção também se refere às composições de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose pelas composições de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

Cátions de metais divalentes

[0074] Qualquer cátion de metal divalente ativador solúvel pode se usado na presente invenção. Em um aspecto preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é selecionado do grupo consistindo de Mn^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, e uma sua combinação. Em um aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mn^{++}. Em outro aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é Co^{++}. Em outro aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mg^{++}. Em outro aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é Ca^{++}. Em outro aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é dois ou mais (vários) cátions selecionados do grupo consistindo de Mn^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, e Ca^{++}. Em um aspecto muito mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mn^{++}. Em outro aspecto muito mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mg^{++}.

[0075] O cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de preferivelmente cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM, mais preferivelmente cerca de 0,01 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, ainda mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 5 mM, muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 2,5 mM, e ainda muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 1 mM.

[0076] Em um aspecto preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM. Em um aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de cerca de 0,01 mM a cerca de 25 mM. Em um aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente

ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM. Em um aspecto mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM. Em um aspecto ainda mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de cerca de 0,3 mM a cerca de 5 mM. Em um aspecto muito mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de cerca de 0,3 mM a cerca de 2,5 mM. Em um aspecto ainda muito mais preferido, o cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose em uma concentração eficaz de cerca de 0,3 mM a cerca de 1 mM.

[0077] O cátion de metal divalente ativador solúvel é preferivelmente adicionado como um sal solúvel, tal como, por exemplo, um sal de sulfato, carbonato, cloreto, citrato, nitrato, nitrito, fluoreto, ou iodeto. É bem sabido na arte, conduto, que biomassa celulósica pode compreender numerosos cátions de metais divalentes. Veja, por exemplo, F. B. Salisbury e C. W. Ross: Plant Physiology, Wadsworths Publishing Company, Belmont, California (1992). A biomassa celulósica pode, portanto, ser usada, em parte ou no todo, como uma fonte dos cátions de metais. Os cátions de metais divalentes ativadores podem ser solúveis ou insolúveis. O termo “cátion de metal divalente ativador solúvel” é aqui definido como um cátion de metal divalente que está disponível em solução para aumentar a atividade de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora. O termo “cátion de metal divalente ativador insolúvel” é aqui definido como um cátion de metal divalente que está indisponível em solução para aumentar a atividade de um polipeptídeo

tendo atividade celulolítica intensificadora. O cátion de metal divalente pode estar indisponível porque ele é quelado, por exemplo, por EDTA ou EGTA, ou ele está complexado com um componente da biomassa celulósica, por exemplo, pirofosfato.

[0078] A biomassa celulósica também pode fornecer cátions de metais divalentes solúveis que inibem a celulólise (daqui em diante "cátion de metal divalente inibidor solúvel"). Por exemplo, um cátion de metal divalente inibidor é Zn^{++} ou Fe^{++}. Consequentemente, sob condições nas quais uma mistura de cátions de metais divalentes solúveis está presente, alguns que ativam e outros que inibem celulólise, um excesso de um cátion de metal divalente ativador solúvel é adicionado para suplantar o efeito inibidor dos cátions de metais divalentes inibidores. Em uma tal situação para prevenir que os cátions de metais divalentes inibidores afetem adversamente o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, os métodos da presente invenção adicionalmente compreendem suplementar a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel para manter a concentração eficaz do cátion de metal divalente ativador solúvel dentro da faixa de preferivelmente cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM, mais preferivelmente cerca de 0,01 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, ainda mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 5 mM, muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 2,5 mM, e ainda muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 1 mM por um período suficiente para degradar ou converter o material contendo celulose.

[0079] Em um aspecto preferido, a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel é suplementada durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose para manter uma concentração eficaz de cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM. Em um aspecto mais preferido, a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel é suplementada

durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose para manter uma concentração eficaz de cerca de 0,01 mM a cerca de 25 mM. Em um aspecto mais preferido, a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel é suplementada durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose para manter uma concentração eficaz de cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM. Em um aspecto mais preferido, a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel é suplementada durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose para manter uma concentração eficaz de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM. Em um aspecto ainda mais preferido, a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel é suplementada durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose para manter uma concentração eficaz de cerca de 0,3 mM a cerca de 5 mM. Em um aspecto muito mais preferido, a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel é suplementada durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose para manter uma concentração eficaz de cerca de 0,3 mM a cerca de 2,5 mM. Em um aspecto ainda muito mais preferido, a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel é suplementada durante a degradação ou conversão de um substrato contendo celulose para manter uma concentração eficaz de cerca de 0,3 mM a cerca de 1 mM.

[0080] A concentração de cátions de metais divalentes em biomassa celulósica pode ser determinada usando qualquer método conhecido na arte, tais como absorção atômica, eletrodos eletroquímicos, biossensores de íon de metal, ou sensores ópticos, ou titulação por quelação (veja, por exemplo, Methods in Enzymology, v.158 (múltiplos capítulos), Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6th ed.; Molecular Probes, Inc.: Eugene, OR, 1996., Thompson *et al. Anal. Chem.,* 70 (22), 4717-4723, 1998, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Akbar Montaser (Editor) May 1998).

[0081] Nos métodos da presente invenção, um cátion de metal divalente ativador solúvel aumenta a atividade de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente pelo menos 0,1-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,2-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,3-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,4-vez, mais preferivelmente pelo menos 0,5-vez, mais preferivelmente pelo menos 1-vez, mais preferivelmente pelo menos 3-vezes, mais preferivelmente pelo menos 4-vezes, mais preferivelmente pelo menos 5-vezes, mais preferivelmente pelo menos 10-vezes, mais preferivelmente pelo menos 20-vezes, ainda mais preferivelmente pelo menos 30-vezes, muito mais preferivelmente pelo menos 50-vezes, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 100-vezes.

Composições de enzimas celulolíticas

[0082] A presente invenção também se refere às composições compreendendo um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de preferivelmente cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM, mais preferivelmente cerca de 0,01 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, ainda mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 5 mM, muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 2,5 mM, e ainda muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 1 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

[0083] A presente invenção também se refere às composições de

enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de preferivelmente cerca de 0,001 mM a cerca de 50 mM, mais preferivelmente cerca de 0,01 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM, mais preferivelmente cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM, ainda mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 5 mM, muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 2,5 mM, e ainda muito mais preferivelmente cerca de 0,3 mM a cerca de 1 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose pelas composições de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel.

[0084] Nos métodos da presente invenção, a composição de enzimas celulolíticas pode compreender qualquer proteína envolvida no processamento de um material contendo celulose em glicose, ou hemicelulose em xilose, manose, galactose, e arabinose, seus polímeros, ou produtos derivados deles como descrito abaixo. Em um aspecto, a composição de enzimas celulolíticas compreende uma endoglicanase, uma celobioidrolase, uma beta-glicosidase, ou uma sua combinação. Em outro aspecto, a composição de enzimas celulolíticas adicionalmente compreende uma ou mais atividades de enzima adicionais para melhorar a degradação do material contendo celulose. Enzimas adicionais preferidas são hemicelulases, esterases (*e.g.*, lipases, fosfolipases, e/ou cutinases), proteases, lacases, peroxidases, ou suas misturas.

[0085] A composição de enzimas celulolíticas pode ser uma

preparação de monocomponente, *e.g.*, uma endoglicanase, pode ser uma preparação de multicomponentes, *e.g.*, endoglicanase(s), celobioidrolase(s), e beta-glicosidase(s), ou uma combinação de preparações de proteínas de monocomponente e multicomponentes. As proteínas celulolíticas podem ter atividade, *i.e.*, hidrolisar o material contendo celulose, na faixa de pH quer ácida, neutra, quer alcalina.

[0086] Como mencionado acima, as proteínas celulolíticas usadas na presente invenção podem ser preparações de monocomponente, *i.e.*, um componente essencialmente livre de outros componentes celulolíticos. O componente único pode ser um componente recombinante, *i.e.*, produzido por clonagem de uma sequência de DNA codificadora de o componente único e subsequente célula transformada com a sequência de DNA e expressada em um hospedeiro (veja, por exemplo, WO 91/17243 e WO 91/17244). A célula hospedeira pode ser um hospedeiro heterólogo (enzima é estranha ao hospedeiro) ou o hospedeiro também pode ser um hospedeiro de tipo selvagem (a enzima é nativa ao hospedeiro). Proteínas celulolíticas de monocomponente também podem ser preparadas por purificação de uma tal proteína de um caldo de fermentação.

[0087] As enzimas usadas na presente invenção podem estar em qualquer forma adequada para uso nos processos aqui descritos, tal como, por exemplo, um caldo de fermentação bruto com ou sem células, um granulado ou pó seco, um granulado não-liberador de poeira, um líquido, um líquido estabilizado, ou uma enzima protegida. Granulados podem ser produzidos, *e.g.*, como revelado em Patentes U.S. Nos. 4.106.991 e 4.661.452, e podem ser opcionalmente revestidos por processo conhecido na arte. Preparações líquidas de enzima podem, por exemplo, ser estabilizadas pela adição de estabilizadores tais como um açúcar, um álcool de açúcar ou outro poliol, e/ou ácido lático ou outro ácido orgânico de acordo com processo estabelecido. Enzimas protegidas podem ser preparadas de acordo com o processo revelado

em EP 238.216.

[0088] Um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica pode ser obtido de microorganismos de qualquer gênero. O termo “obtido de” significa aqui que a enzima pode ter sido isolada de um organismo que naturalmenter produz a enzima como uma enzima nativa. O termo "obtido de" também significa que a enzima pode ter sido produzida recombinantemente em um organismo hospedeiro, sendo que a enzima recombinantemente produzida é quer nativa quer estranha ao organismo hospedeiro ou tem uma sequência de aminoácidos modificada, *e.g.*, tendo um ou mais aminoácidos que estão deletados, inseridos e/ou substituído, *i.e.*, uma enzima recombinantemente produzida que é um mutante e/ou um fragmento de uma sequência de aminoácidos nativa ou uma enzima produzida por processos de rearranjo de ácido nucleico conhecidos na arte. Incluídas dentro do significado de uma enzima nativa estão as variantes naturais e dentro do significado de uma enzima estranha estão as variantes obtidas por mutagênese química ou recombinante, tal como por mutagênese sítio-direcionada ou rearranjo. Consequentemente, mutantes engenhados de proteína ou quimicamente modificados de proteínas celulolíticas também podem ser usados na presente invenção. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo obtido de uma dada fonte é secretado extracelularmente.

[0089] Um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica pode ser um polipeptídeo bacteriano. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo de bactéria Gram-positiva tal como um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Bacillus*, *Streptococcus, Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, ou *Oceanobacillus*, ou um polipeptídeo de bactéria Gram-negativa tal como um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, ou *Ureaplasma*.

[0090] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis*, ou *Bacillus thuringiensis*.

[0091] Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis,* ou *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[0092] Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, ou *Streptomyces lividans*.

[0093] O polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica também pode ser um polipeptídeo fúngico, e mais preferivelmente um polipeptídeo de levedura tal como um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia*; ou mais preferivelmente um polipeptídeo de fungo filamentoso tal como um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryospaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptospaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*,

Trichoderma, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, ou *Xylaria*.

[0094] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, ou *Saccharomyces oviformis*.

[0095] Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, ou *Trichophaea saccata*.

[0096] Nos métodos da presente invenção, qualquer endoglicanase,

celobioidrolase, e/ou beta-glicosidase, bem como qualquer outra enzima celulolítica, pode ser usada.

[0097] Exemplos de endoglicanases bacterianas que podem ser usadas na presente invenção, incluem, mas não são limitadas a, uma endoglicanase de *Acidothermus cellulolyticus* (WO 91/05039; WO 93/15186; Patente U.S. No. 5.275.944; WO 96/02551; Patente U.S. No. 5.536.655, WO 00/70031, WO 05/093050); endoglicanase III de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050); e endoglicanase V de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050).

[0098] Exemplos de endoglicanases fúngicas que podem ser usadas na presente invenção, incluem, mas não são limitadas a, uma endoglicanase I de *Trichoderma reesei* (Penttila *et al.*, 1986, *Gene* 45: 253-263; Número de acesso em GenBank™ de M15665); endoglicanase II de *Trichoderma reesei* (Saloheimo *et al.*, 1988, *Gene* 63:11-22; Número de acesso em GenBank™ de M19373); endoglicanase III de *Trichoderma reesei* (Okada *et al.*, 1988, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 555-563; Número de acesso em GenBank™ de AB003694); endoglicanase IV de *Trichoderma reesei* (Saloheimo *et al.*, 1997, *Eur. J. Biochem.* 249: 584-591; Número de acesso em GenBank™ de Y11113); e endoglicanase V de *Trichoderma reesei* (Saloheimo *et al.*, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 219-228; Número de acesso em GenBank™ de Z33381); endoglicanase de *Aspergillus aculeatus* (Ooi *et al.,* 1990, *Nucleic Acids Research* 18: 5884); endoglicanase de *Aspergillis kawachii* (Sakamoto *et al.*, 1995, *Current Genetics* 27: 435-439); *Chrysosporium* sp. C1 (Patente U.S. No. 6.573.086; Número de acesso em GenPept de AAQ38150); *Corynascus heterothallicus* (Patente U.S. No. 6,855,531; Número de acesso em GenPept de AAY00844); endoglicanase de *Erwinia carotovara* (Saarilahti *et al.*, 1990, *Gene* 90: 9-14); endoglicanase de *Fusarium oxysporum* (Número de acesso em GenBank™ de L29381); endoglicanase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Número de acesso em GenBank™ de AB003107); endoglicanase de *Melanocarpus albomyces* (Número de acesso em GenBank™ de

MAL515703); endoglicanase de *Neurospora crassa* (Número de acesso em GenBank™ de XM_324477); *Piromyces equi* (Eberhardt *et al.*, 2000, *Microbiology* 146: 1999-2008; Número de acesso em GenPept de CAB92325); *Rhizopus oryzae* (Moriya *et al.*, 2003, *J. Bacteriology* 185: 1749-1756; Números de acesso em GenBank™ de AB047927, AB056667, e AB056668); e *Thielavia terrestris* (WO 2004/053039; Número de acesso em EMBL de CQ827970).

[0099] Outras endoglicanases são reveladas em mais do que 13 das famílias de Glicosil Hidrolase usando a classificação de acordo com Henrissat B., 1991, "A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities", *Biochem. J.* 280: 309-316, e Henrissat B., e Bairoch A., 1996, "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases", *Biochem. J.* 316: 695-696.

[00100] Em um aspecto preferido, a endoglicanase é uma endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei*. Em outro aspecto preferido, a endoglicanase é uma endoglicanase II (CEL5A) de *Trichoderma reesei*. Em outro aspecto preferido, a endoglicanase é uma endoglicanase III (CEL12A) de *Trichoderma reesei*. Em outro aspecto preferido, a endoglicanase é uma endoglicanase V (CEL45A) de *Trichoderma reesei*. Em outro aspecto preferido, a endoglicanase é uma endoglicanase CEL7 de *Myceliophthora thermophila*. Em outro aspecto preferido, a endoglicanase é uma endoglicanase CEL12 de *Chrysosporium lucknowense*. Em outro aspecto preferido, a endoglicanase é uma endoglicanase CEL45 de *Chrysosporium lucknowense*.

[00101] Em um aspecto mais preferido, a endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 74 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase II (CEL5A) de *Trichoderma reesei* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 76 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto

mais preferido, a endoglicanase III (CEL12A) de *Trichoderma reesei* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 78 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase V (CEL45A) de *Trichoderma reesei* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 80 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase CEL7 de *Myceliophthora thermophila* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 82 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase CEL12 de *Myceliophthora thermophila* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 84 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase CEL45 de *Myceliophthora thermophila* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 86 ou um seu ortólogo ou uma sua variante.

[00102] Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 73 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase II (CEL5A) de *Trichoderma reesei* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 75 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase III (CEL12A) de *Trichoderma reesei* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 77 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase V (CEL45A) de *Trichoderma reesei* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 79 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase CEL7 de *Myceliophthora thermophila* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 81 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase CEL12 de *Chrysosporium* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 83 ou um seu ortólogo

ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a endoglicanase CEL45 de *Chrysosporium* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 85 ou um seu ortólogo ou uma sua variante.

[00103] A endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei* pode ser obtida de acordo com Penttila *et al.*, 1986, *Gene* 45: 253-263. A endoglicanase II (CEL5A) de *Trichoderma reesei* pode ser obtida de acordo com Saloheimo *et al.*, 1988, *Gene* 63:11-22. A endoglicanase III (CEL12A) de *Trichoderma reesei* pode ser obtida de acordo com Okada *et al.*, 1988, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 555-563. A endoglicanase V (CEL45A) de *Trichoderma reesei* pode ser obtida de acordo com Saloheimo *et al.*, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 219-228. A endoglicanase CEL7 de *Myceliophthora thermophila* pode ser obtida de acordo com WO 95/024471. A endoglicanase CEL12 de *Chrysosporium lucknowense* pode ser obtida de acordo com WO 2001/25468. A endoglicanase CEL45 de *Chrysosporium lucknowense* pode ser obtida de acordo com WO 2000/20555.

[00104] Em outro aspecto preferido, a celobioidrolase é uma celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei*. Em outro aspecto preferido, a celobioidrolase é uma celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei*. Em outro aspecto preferido, a celobioidrolase é uma celobioidrolase CEL7 de *Chrysosporium lucknowense* com um domínio ligante de celulose. Em outro aspecto preferido, a celobioidrolase é uma celobioidrolase CEL7 de *Myceliophthora thermophila* sem um domínio ligante de celulose. Em outro aspecto preferido, a celobioidrolase é uma celobioidrolase de *Thielavia terrestris*.

[00105] Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 88 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto preferido, a celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei* é um polipeptídeo maduro

de SEQ ID NO: 90 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase CEL7 de *Chrysosporium lucknowense* com um domínio ligante de celulose é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 92 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase CEL7 de *Myceliophthora thermophila* sem um domínio ligante de celulose é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 94 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase de *Thielavia terrestris* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 96 ou um seu ortólogo ou uma sua variante.

[00106] Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei* celobioidrolase é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 87 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei* celobioidrolase é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 89 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase CEL7 de *Chrysosporium lucknowense* com um domínio ligante de celulose é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 91 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase CEL7 de *Myceliophthora thermophila* sem um domínio ligante de celulose é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 93 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a celobioidrolase de *Thielavia terrestris* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 95 ou um seu ortólogo ou uma sua variante.

[00107] A celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei* pode ser obtida de acordo com Shoemaker *et al.*, 1983, *Biotechnology* (N.Y.) 1: 691-696. A celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei* pode ser obtida de acordo com Terri *et al.*, 1987, *Gene* 51: 43-52. A celobioidrolase CEL7 de

Chrysosporium lucknowense com um domínio ligante de celulose pode ser obtida de acordo com WO 2001/79507. A celobioidrolase CEL7 de *Myceliophthora thermophila* sem um domínio ligante de celulose pode ser obtida de acordo com WO 2003/000941. A celobioidrolase de *Thielavia terrestris* pode ser obtida de acordo com WO 2006/074435.

[00108] Em outro aspecto preferido, a beta-glicosidase é obtida de *Aspergillus oryzae*. Em outro aspecto preferido, a beta-glicosidase é obtida de *Aspergillus fumigatus*. Em outro aspecto preferido, a beta-glicosidase é obtida de *Penicillium brasilianum*, *e.g.*, *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888. Em outro aspecto preferido, a beta-glicosidase é obtida de *Aspergillus niger*. Em outro aspecto preferido, a beta-glicosidase é obtida de *Aspergillus aculeatus*.

[00109] Em um aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 16 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus fumigatus* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 18 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Penicillium brasilianum* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 20 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus niger* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 22 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus aculeatus* é um polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 24 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 15 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus fumigatus* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 17 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais

preferido, a beta-glicosidase de *Penicillium brasilianum* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 19 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus niger* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 21 ou um seu ortólogo ou uma sua variante. Em outro aspecto mais preferido, a beta-glicosidase de *Aspergillus aculeatus* é codificada pela sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 23 ou um seu ortólogo ou uma sua variante.

[00110] O polipeptídeo de *Aspergillus oryzae* tendo atividade de beta-glicosidase pode ser obtido de acordo com WO 2002/095014. O polipeptídeo de *Aspergillus fumigatus* tendo atividade de beta-glicosidase pode ser obtido de acordo com WO 2005/047499. O polipeptídeo de *Penicillium brasilianum* tendo atividade de beta-glicosidase pode ser obtido de acordo com WO 2007/019442. O polipeptídeo de *Aspergillus niger* tendo atividade de beta-glicosidase pode ser obtido de acordo com Dan *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 4973-4980. o polipeptídeo de *Aspergillus aculeatus* tendo atividade de beta-glicosidase pode ser obtido de acordo com Kawaguchi *et al.*, 1996, *Gene* 173: 287-288.

[00111] Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 16 é codificado por um polinucleotídeo contido no plasmídeo que está contido em *E. coli* DSM 14240. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 18 é codificado pelo polinucleotídeo contido no plasmídeo pEJG113 que está contido em *E. coli* NRRL B-30695. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 20 é codificado por um polinucleotídeo contido em plasmídeo pKKAB que está contido em *E. coli* NRRL B-30860.

[00112] Em outro aspecto preferido, a beta-glicosidase é a proteína de fusão BG de variante de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* de SEQ ID NO: 26. Em outro aspecto preferido, a proteína de fusão BG de variante de

beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* é codificada pelo polinucleotídeo de SEQ ID NO: 25. Em outro aspecto preferido, a beta-glicosidase é a proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* de SEQ ID NO: 28. Em outro aspecto preferido, a proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* é codificada pelo polinucleotídeo de SEQ ID NO: 27.

[00113] Exemplos de outras beta-glicosidases que podem ser usadas na presente invenção, incluem, mas não são limitadas a, uma beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (WO 02/095014; WO 04/099228); beta-glicosidase de *Aspergillus aculeatus* (Kawaguchi *et al.,* 1996, *Gene* 173: 287-288); beta-glicosidase de *Aspergillus avenaceus* (Número de acesso em GenBank™ de AY943971); beta-glicosidase de *Aspergillus fumigatus* (Número de acesso em GenBank™ de XM745234); beta-glicosidase de *Aspergillus kawachii* (Número de acesso em GenBank™ de AB003470); beta-glicosidase de *Aspergillus niger* (GenBank™ AJ132386); beta-glicosidase de *Magnaporthe griseuma* (Número de acesso em GenBank™ de AY849670); beta-glicosidase de *Phanerochaete chrysosporium* (Número de acesso em GenBank™ de AB253327); beta-glicosidase de *Talaromyces emersonii* (Número de acesso em GenBank™ de AY072918), e beta-glicosidase de *Trichoderma reesei* (Números de acesso em GenBank™ de U09580, AB003110, AY281374, AY281375, AY281377, AY281378, e AY281379). Variantes de beta-glicosidases também podem ser usadas tais como aquelas descritas em WO 04/099228.

[00114] Outras beta-glicosidases são reveladas em mais do que 13 das famílias de Glicosil Hidrolase usando a classificação de acordo com Henrissat B., 1991, "A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities", *Biochem. J.* 280: 309-316, e Henrissat B., e Bairoch A., 1996, "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases", *Biochem. J.* 316: 695-696.

[00115] Será entendido que para as espécies anteriormente

mencionadas a invenção inclui ambos os estados perfeito e imperfeito, e outros equivalentes taxonômicos, *e.g.*, anamorfos, independente do nome da espécie pelo qual são conhecidos. Aquelas pessoas experientes na arte prontamente reconhecerão a identidade de equivalentes apropriados.

[00116] Cepas destas espécies são prontamente acessíveis ao público em numerosas coleções de culturas, tais como a American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), e Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[00117] Ademais, tais polipeptídeos podem ser identificados e obtidos de outras fontes incluindo microorganismos isolados da natureza (*e.g.*, solo, adubos compostos, água, etc.) usando as sondas acima mencionadas. Técnicas para isolar microorganismos de hábitats naturais são bem conhecidas na arte. O polinucleotídeo pode ser então obtido por seleção similar de uma biblioteca genômica ou de cDNA de um tal microorganismo. Uma vez tendo sido detectada uma sequência de polinucleotídeo codificadora de um polipeptídeo com a(s) sonda(s), o polinucleotídeo pode ser isolado ou clonado pela utilização de técnicas que são bem conhecidas por aquelas pessoas ordinariamente experientes na arte (veja, *e.g.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[00118] Polipeptídeos tendo atividade de enzima celulolítica também incluem polipeptídeos fusionados ou polipeptídeos de fusão cliváveis nos quais outro polipeptídeo está fusionado na terminação-N ou na terminação-C do polipeptídeo ou de seu fragmento tendo atividade de enzima celulolítica. Um polipeptídeo fusionado é produzido pela fusão de uma sequência de nucleotídeos (ou uma sua porção) codificadora de outro polipeptídeo em uma sequência de nucleotídeos (ou uma sua porção) codificadora de um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica. Técnicas para produzir polipeptídeos de fusão são conhecidas na arte, e incluem ligação de

sequências codificadoras que codificam os polipeptídeos de modo que estejam em matriz e que a expressão do polipeptídeo fusionado esteja sob controle do(s) mesmo(s) promotor(es) e terminador.

[00119] Um polipeptídeo de fusão pode adicionalmente compreender um sítio de clivagem. Sob secreção da proteína de fusão, o sítio é clivado liberando o polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica da proteína de fusão. Exemplos de sítios de clivagem incluem, mas não são limitadas a, um sítio Kex2 que codifica o dipeptídeo Lys-Arg (Martin *et al.*, 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3: 568-76; Svetina *et al.*, 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; e Contreras *et al.*, 1991, *Biotechnology* 9: 378-381), um sítio Ile-(Glu ou Asp)-Gly-Arg site, que é clivado por uma Factor Xa protease após o resíduo de arginina (Eaton *et al.*, 1986, *Biochem.* 25: 505-512); um sítio Asp-Asp-Asp-Asp-Lys site, que é clivado por uma enteroquinase após a lisina (Collins-Racie *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 982-987); um sítio His-Tyr-Glu ou sítio His-Tyr-Asp, que é clivado por Genenase I (Carter *et al.*, 1989, *Proteins: Structure, Function, e Genetics* 6: 240-248); um sítio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que é clivado por trombina após a Arg (Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48*)*; um sítio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly site, que é clivado por TEV protease após a Gln (Stevens, 2003, *supra*); e um sítio Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que é clivado por uma forma geneticamente engenhada de protease 3C de rinovírus de humano após a Gln (Stevens, 2003, *supra*).

[00120] Em um aspecto preferido, a composição de enzimas celulolíticas compreende uma beta-glicosidase; uma celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei*, uma celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei*, e uma endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei*.

[00121] Em outro aspecto preferido, a composição de enzimas celulolíticas compreende uma beta-glicosidase; uma celobioidrolase I

(CEL7A) de *Trichoderma reesei*, uma celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei*, e uma endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei*, e adicionalmente compreende uma ou mais enzimas selecionadas do grupo consistindo de uma endoglicanase II (CEL5A) de *Trichoderma reesei*, uma endoglicanase V (CEL45A) de *Trichoderma reesei*, e uma endoglicanase III (CEL12A) de *Trichoderma reesei*.

[00122] Em outro aspecto preferido, a composição de enzimas celulolíticas compreende uma beta-glicosidase; uma celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei*, uma celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei*, e uma endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei*, e adicionalmente compreende uma celobioidrolase de *Thielavia terrestris*.

[00123] Em outro aspecto preferido, a composição de enzimas celulolíticas compreende uma beta-glicosidase; uma celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei*, uma celobioidrolase II (CEL6A) de *Trichoderma reesei*, e uma endoglicanase I (CEL7B) de *Trichoderma reesei*, e adicionalmente compreende (1) uma ou mais enzimas selecionadas do grupo consistindo de uma endoglicanase II (CEL5A) de *Trichoderma reesei*, uma endoglicanase V (CEL45A) de *Trichoderma reesei*, e uma endoglicanase III (CEL12A) de *Trichoderma reesei*, e/ou adicionalmente compreende (2) uma celobioidrolase de *Thielavia terrestris*.

[00124] Em outro aspecto preferido, a composição de enzimas celulolíticas compreende um ou mais (vários) componentes selecionados do grupo consistindo de um polipeptídeo CEL7 de *Myceliophthora thermophila* tendo atividade de endoglicanase, um polipeptídeo CEL12 de *Chrysosporium lucknowense* tendo atividade de endoglicanase, um polipeptídeo CEL45 de *Chrysosporium lucknowense* tendo atividade de endoglicanase, um polipeptídeo CEL7 de *Chrysosporium lucknowense* tendo atividade de celobioidrolase com um domínio ligante de celulose, e um polipeptídeo CEL7 de *Myceliophthora thermophila* tendo atividade de celobioidrolase sem um

domínio ligante de celulose. Em outro aspecto preferido, a composição de enzimas celulolíticas compreende um polipeptídeo CEL7 de *Myceliophthora thermophila* tendo atividade de endoglicanase, um polipeptídeo CEL12 de *Chrysosporium lucknowense* tendo atividade de endoglicanase, um polipeptídeo CEL45 de *Chrysosporium lucknowense* tendo atividade de endoglicanase, um polipeptídeo CEL7 tendo atividade de celobioidrolase com um domínio ligante de celulose, e um polipeptídeo CEL7 de *Myceliophthora thermophila* tendo atividade de celobioidrolase sem um domínio ligante de celulose. Em outro aspecto preferido, a composição acima adicionalmente compreende um ou mais (vários) polipeptídeos tendo atividade de beta-glicosidase.

[00125] A composição de enzimas celulolíticas também pode ser uma preparação comercial. Exemplos de preparações de enzimas celulolíticas comerciais adequadas para uso na presente invenção incluem, por exemplo, CELLUCLAST™ (disponível em Novozymes A/S) e NOVOZYM™ 188 (disponível em Novozymes A/S). Outras preparações comercialmente disponíveis que podem ser utilizadas incluem CELLUZYME™, CEREFLO™ e ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAMINEX™ e SPEZYME™ CP (Genencor Int.), ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH), e FIBREZYME® LDI, FIBREZYME® LBR, ou VISCOSTAR® 150L (Dyadic International, Inc., Jupiter, FL, USA).

[00126] Outras proteínas celulolíticas que podem ser úteis na presente invenção são descritas em EP 495,257, EP 531,315, EP 531,372, WO 89/09259, WO 94/07998, WO 95/24471, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 96/034108, WO 97/14804, WO 98/08940, WO 98/012307, WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 98/028411, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025846, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2000/009707, WO 2002/050245, WO 2002/0076792, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO

2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, Patente U.S. No. 4.435.307, Patente U.S. No. 5.457.046, Patente U.S. No. 5.648.263, Patente U.S. No. 5.686.593, Patente U.S. No. 5.691.178, Patente U.S. No. 5.763.254. e Patente U.S. No. 5.776.757.

[00127] As proteínas celulolíticas usadas nos métodos da presente invenção podem ser produzidas por fermentação das cepas microbianas anotadas acima sobre um meio nutriente contendo fontes de carbono e de nitrogênio adequadas e sais inorgânicos apropriados, usando procedimentos conhecidos na arte (veja, *e.g.*, Bennett, J.W. e LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Meios adequados estão disponíveis em fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (*e.g.*, em catálogos da American Type Culture Collection). Faixas de temperatura e outras condições adequadas para crescimento e produção de proteína celulolítica são conhecidas na arte (veja, *e.g.*, Bailey, J.E., e Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

[00128] A fermentação pode ser qualquer método de cultivo de uma célula resultando na expressão ou no isolamento de uma proteína celulolítica. Fermentação, pode, portanto, ser entendida como compreendendo cultivo em frasco agitador, ou fermentação em escala pequena ou grande (incluindo fermentações no estado sólido, em batelada alimentada, em batelada ou contínua) em fermentadores de laboratório ou industriais realizada em um meio apropriado e sob condições que permitem que a proteína celulolítica seja expressada ou isolada. As proteínas celulolíticas resultantes produzidas pelos métodos descritos acima podem ser recuperadas do meio de fermentação e purificadas por procedimentos convencionais como aqui descritos.

Polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora

[00129] Em um primeiro aspecto, polipeptídeos isolados tendo atividade celulolítica intensificadora, compreendem os seguintes motivos:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] e [FW]-[TF]-K-[AIV],

sendo que X é qualquer aminoácido, X(4,5) é qualquer aminoácido em 4 ou 5 posições contíguas, e X(4) é qualquer aminoácido em 4 posições contíguas.

[00130] O polipeptídeo isolado compreendendo os motivos acima anotados pode adicionalmente compreender:

H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV],

[EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV], ou

H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] e [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV],

sendo que X é qualquer aminoácido, X(1,2) é qualquer aminoácido em 1 posição ou 2 posições contíguas, X(3) é qualquer aminoácido em 3 posições contíguas, e X(2) é qualquer aminoácido em 2 posições contíguas. Nos motivos acima, é utilizada a abreviação de aminoácido de letra única de IUPAC aceita.

[00131] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo isolado tendo atividade celulolítica intensificadora adicionalmente compreende H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV]. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo isolado tendo atividade celulolítica intensificadora adicionalmente compreende [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV]. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo isolado tendo atividade celulolítica intensificadora adicionalmente compreende H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] e [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].

Em um segundo aspecto, os polipeptídeos isolados tendo atividade celulolítica intensificadora, compreendem os seguintes motivos:

[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ],

sendo que X é qualquer aminoácido, x(4,5) é qualquer aminoácido em 4 ou 5 posições contíguas, e X(3) é qualquer aminoácido em 3 posições contíguas. Nos motivos acima, é utilizada a abreviação de aminoácido de letra única de IUPAC aceita.

[00132] Em um terceiro aspecto, os polipeptídeos isolados tendo atividade celulolítica intensificadora têm uma sequência de aminoácidos que tem um grau de identidade com o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 14 de preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99%, que têm atividade celulolítica intensificadora (daqui em diante "polipeptídeos homogêneos"). Em um aspecto preferido, os polipeptídeos homogêneos têm uma sequência de aminoácidos que difere em dez aminoácidos, preferivelmente em cinco aminoácidos, mais preferivelmente em quatro aminoácidos, ainda mais preferivelmente em três aminoácidos, muito mais preferivelmente em dois aminoácidos, e ainda muito mais preferivelmente em um aminoácido do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 14.

[00133] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO:

2. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 326 de SEQ ID NO: 2, ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 326 de SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 326 de SEQ ID NO: 2 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 326 de SEQ ID NO: 2.

[00134] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 4. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 18 a 240 de SEQ ID NO: 4, ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 18 a 240 de SEQ ID NO: 4. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste do

polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 4. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 18 a 240 de SEQ ID NO: 4 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 18 a 240 de SEQ ID NO: 4.

[00135] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 6. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 258 de SEQ ID NO: 6, ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 258 de SEQ ID NO: 6. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 6. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 258 de SEQ ID NO: 6 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 258 de SEQ ID NO: 6.

[00136] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo

compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 8. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 19 a 226 de SEQ ID NO: 8, ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 19 a 226 de SEQ ID NO: 8. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 8. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 19 a 226 de SEQ ID NO: 8 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 19 a 226 de SEQ ID NO: 8.

[00137] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 10. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 304 de SEQ ID NO: 10, ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 304 de SEQ ID NO: 10. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica

intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 10. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 304 de SEQ ID NO: 10 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 304 de SEQ ID NO: 10.

[00138] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 12. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 23 a 250 de SEQ ID NO: 12, ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 23 a 250 de SEQ ID NO: 12. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 12. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 23 a 250 de SEQ ID NO: 12 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 23 a 250 de SEQ ID NO: 12.

[00139] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora preferivelmente compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14

ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 14. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 249 de SEQ ID NO: 14, ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo compreende aminoácidos 20 a 249 de SEQ ID NO: 14. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 14. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 249 de SEQ ID NO: 14 ou uma variante alélica da mesma; ou um fragmento da mesma que tem atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo consiste dos aminoácidos 20 a 249 de SEQ ID NO: 14.

[00140] Preferivelmente, um fragmento do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2 contém pelo menos 277 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 287 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 297 resíduos de aminoácido. Preferivelmente, um fragmento do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 4 contém pelo menos 185 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 195 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 205 resíduos de aminoácido. Preferivelmente, um fragmento do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 6 contém pelo menos 200 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 212 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 224 resíduos de aminoácido. Preferivelmente, um

fragmento do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 8 contém pelo menos 175 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 185 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 195 resíduos de aminoácido. Preferivelmente, um fragmento do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 10 contém pelo menos 240 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 255 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 270 resíduos de aminoácido. Preferivelmente, um fragmento do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 12 contém pelo menos 175 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 190 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 205 resíduos de aminoácido. Preferivelmente, um fragmento do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 14 contém pelo menos 200 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente pelo menos 210 resíduos de aminoácido, e muito mais preferivelmente pelo menos 220 resíduos de aminoácido.

[00141] Preferivelmente, uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1 contém pelo menos 831 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 861 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 891 nucleotídeos. Preferivelmente, uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 3 contém pelo menos 555 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 585 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 615 nucleotídeos. Preferivelmente, uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 5 contém pelo menos 600 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 636 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 672 nucleotídeos. Preferivelmente, uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 7 contém pelo menos 525 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 555 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 585 nucleotídeos. Preferivelmente, uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo

maduro de SEQ ID NO: 9 contém pelo menos 720 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 765 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 810 nucleotídeos. Preferivelmente, uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de nucleotídeos 67 a 796 SEQ ID NO: 11 contém pelo menos 525 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 570 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 615 nucleotídeos. Preferivelmente, uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 13 contém pelo menos 600 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos 630 nucleotídeos, e muito mais preferivelmente pelo menos 660 nucleotídeos.

[00142] Em um quarto aspecto, os polipeptídeos isolados tendo atividade celulolítica intensificadora são codificados por polinucleotídeos que hibridizam sob condições de estringência pelo menos muito baixa, preferivelmente condições de estringência pelo menos baixa, mais preferivelmente condições de estringência pelo menos média, mais preferivelmente condições de estringência pelo menos média-alta, ainda mais preferivelmente condições de estringência pelo menos alta, e muito mais preferivelmente condições de estringência pelo menos muito alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO: 13, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 11, ou a sequência de DNA genômico compreendendo a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, ou SEQ ID NO: 13, (iii) uma subsequência de (i) ou (ii), ou (iv) uma fita complementar de comprimento total de (i), (ii), ou (iii) (J J. Sambrook, E.F. Fritsch, e T. Maniatis, 1989, *supra*). Uma subsequência da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO:

13 contém pelo menos 100 nucleotídeos contíguos ou preferivelmente pelo menos 200 nucleotídeos contíguos. Além disso, a subsequência pode codificar um fragmento de polipeptídeo que tem atividade celulolítica intensificadora. Em um aspecto preferido, a sequência codificadora de polipeptídeo maduro é de nucleotídeos 388 a 1332 de SEQ ID NO: 1, nucleotídeos 98 a 821 de SEQ ID NO: 3, nucleotídeos 126 a 978 de SEQ ID NO: 5, nucleotídeos 55 a 678 de SEQ ID NO: 7, nucleotídeos 58 a 912 de SEQ ID NO: 9, nucleotídeos 67 a 796 de SEQ ID NO: 11, ou nucleotídeos 77 a 766 de SEQ ID NO: 13..

[00143] A sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO: 13, ou uma subsequência da mesma; bem como a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 14, ou um fragmento da mesma, podem ser usadas para planejar uma sonda de ácido nucleico e clonar DNA codificador de polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora de cepas de gêneros ou espécies diferentes, como descrito *supra.*

[00144] Para os propósitos da presente invenção, hibridização indica que a sequência de nucleotídeos hibridiza com uma sonda de ácido nucleico marcada correspondendo à sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO: 13, à sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 11, ou à sequência de DNA genômico compreendendo à sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, ou SEQ ID NO: 13, sua fita complementar de comprimento total, ou uma subsequência da mesma, sob condições de estringência muito baixa a muito alta, como descrito *supra*.

[00145] E Em um aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a

sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 388 a 1332 de SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 2, ou uma subsequência da mesma. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pEJG120 que está contido em *E. coli* NRRL B-30699, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pEJG120 que está contido em *E. coli* NRRL B-30699..

[00146] Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 3. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 98 a 821 de SEQ ID NO: 3. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 4, ou uma subsequência da mesma. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 3. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pTter61C que está contido em *E. coli* NRRL B-30813, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61C que está contido em *E. coli* NRRL B-30813.

[00147] Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 5. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 126 a 978 de SEQ ID NO: 5. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma

sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 6, ou uma subsequência da mesma. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 5. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pTter61D que está contido em *E. coli* NRRL B-30812, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61D que está contido em *E. coli* NRRL B-30812.

[00148] Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 7. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 55 a 678 de SEQ ID NO: 7. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 8, ou uma subsequência da mesma. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 7. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pTter61E que está contido em *E. coli* NRRL B-30814, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61E que está contido em *E. coli* NRRL B-30814.

[00149] Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 9. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 58 a 912 de SEQ ID NO: 9 Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 10, ou uma subsequência da mesma. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 9. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido

nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pTter61G que está contido em *E. coli* NRRL B-30811, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61G que está contido em *E. coli* NRRL B-30811.

[00150] Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 11. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 67 a 796 de SEQ ID NO: 11. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 12, ou uma subsequência da mesma. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 11. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pDZA2-7 que está contido em *E. coli* NRRL B-30704, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pDZA2-7 que está contido em *E. coli* NRRL B-30704.

[00151] Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 13. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é de nucleotídeos 77 a 766 de SEQ ID NO: 13. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é uma sequência de polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO: 14, ou uma subsequência da mesma. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é SEQ ID NO: 13. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência de polinucleotídeo contida em plasmídeo pTr333 que está contido em *E. coli* NRRL B-30878, sendo que a sua sequência de polinucleotídeo codifica um polipeptídeo tendo atividade celulolítica

intensificadora. Em outro aspecto preferido, a sonda de ácido nucleico é a sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTr333 que está contido em *E. coli* NRRL B-30878.

[00152] Para sondas longas de pelo menos 100 nucleotídeos em comprimento, condições de estringência muito baixa a muito alta são como aqui definidas.

[00153] Para sondas longas de pelo menos 100 nucleotídeos em comprimento, o material de suporte é finalmente lavado como aqui definido.

[00154] Para sondas curtas de cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 70 nucleotídeos em comprimento, condições de estringência são como aqui definidas.

[00155] Para sondas curtas de cerca de 15 nucleotídeos a cerca de 70 nucleotídeos em comprimento, o material de suporte é lavado como aqui definido.

[00156] Em um quinto aspecto, polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora são codificados por polinucleotídeos compreendendo ou consistindo de sequências de nucleotídeos que têm um grau de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO: 13 de preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99%, que codifica um polipeptídeo ativo tendo atividade celulolítica intensificadora..

[00157] Em um aspecto preferido, a sequência codificadora de polipeptídeo maduro é de nucleotídeos 388 a 1332 de SEQ ID NO: 1,

nucleotídeos 98 a 821 de SEQ ID NO: 3, nucleotídeos 126 a 978 de SEQ ID NO: 5, nucleotídeos 55 a 678 de SEQ ID NO: 7, nucleotídeos 58 a 912 de SEQ ID NO: 9, nucleotídeos 67 a 796 de SEQ ID NO: 11, ou nucleotídeos 77 a 766 de SEQ ID NO: 13. Veja seção de polinucleotídeo aqui.

[00158] Em um sexto aspecto, polipeptídeos isolados tendo atividade celulolítica intensificadora são variantes artificiais compreendendo uma substituição, deleção, e/ou inserção de um ou mais (vários) aminoácidos do polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 14; ou uma sua sequência homóloga. Métodos para preparar tais variantes artificiais são descritos *supra*.

[00159] O número total de substituições, deleções e/ou inserções de aminoácido do = polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 14, é 10, preferivelmente 9, mais preferivelmente 8, mais preferivelmente 7, mais preferivelmente no máximo 6, mais preferivelmente 5, mais preferivelmente 4, ainda mais preferivelmente 3, muito mais preferivelmente 2, e ainda muito mais preferivelmente 1.

Fontes para polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora

[00160] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora pode ser obtido de microorganismos de qualquer gênero. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo obtido de uma dada fonte é secretado extracelularmente.

[00161] Um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora pode ser um polipeptídeo bacteriano. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo de bactéria Gram-positiva tal como um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Bacillus*, *Streptococcus, Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*,

Clostridium, *Geobacillus*, ou *Oceanobacillus* tendo atividade celulolítica intensificadora, ou um polipeptídeo de bactéria Gram-negativa tal como um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, ou *Ureaplasma*.

[00162] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis*, ou *Bacillus thuringiensis*.

[00163] Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis,* ou *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[00164] Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, ou *Streptomyces lividans*.

[00165] O polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora também pode ser um polipeptídeo de fungo, e mais preferivelmente um polipeptídeo de levedura tal como um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia*; ou mais preferivelmente um polipeptídeo de fungo filamentoso tal como um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryospaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*,

Fusarium, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptospaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, ou *Xylaria*.

[00166] Em um aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, ou *Saccharomyces oviformis*.

[00167] Em outro aspecto preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*,

Thielavia albopilosa, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, ou *Trichophaea saccata*.

[00168] Em um aspecto mais preferido, o polipeptídeo um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Thielavia terrestris*. Em uma modalidade mais preferida, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Thielavia terrestris* NRRL 8126, *e.g.*, o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, ou 10, ou seus fragmentos que têm atividade celulolítica intensificadora.

[00169] Em outro aspecto mais preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus*, *e.g.*, o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 12.

[00170] Em outro aspecto mais preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Trichoderma reesei* polipeptídeo. Em outro aspecto muito mais preferido, o polipeptídeo é um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora de *Trichoderma reesei* RutC30 (ATCC 56765) *e.g.*, o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 14, ou seus fragmentos que têm atividade celulolítica intensificadora.

[00171] Será entendido que para as espécies anteriormente mencionadas a invenção inclui ambos os estados perfeito e imperfeito, e outros equivalentes taxonômicos, *e.g.*, anamorfos, independente do nome da espécie pelo qual são conhecidos. Aquelas pessoas experientes na arte prontamente reconhecerão a identidade de equivalentes apropriados.

[00172] Cepas destas espécies são prontamente acessíveis ao público em numerosas coleções de culturas, tais como a American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), e

Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[00173] Ademais, tais polipeptídeos podem ser identificados e obtidos de outras fontes incluindo microorganismos isolados da natureza (*e.g.*, solo, adubos compostos, água, etc.) usando as sondas mencionadas acima, como aqui descrito.

[00174] Polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora também incluem polipeptídeos fusionados ou polipeptídeos de fusão cliváveis nos quais outro polipeptídeo está fusionado na terminação-N ou na terminação-C do polipeptídeo ou de seu fragmento tendo atividade celulolítica intensificadora, e podem adicionalmente compreender um sítio de clivagem, como aqui descrito.

[00175] Para outros detalhes sobre polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora e seus polinucleotídeos, veja WO 2005/074647, WO 2005/074656, e Pedido Publicado U.S. de No. Serial 2007/0077630, que são aqui incorporados como referências.

Polinucleotídeos codificadores de polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora

[00176] Polinucleotídeos compreendendo sequências de nucleotídeos que codificam polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora podem ser isolados e utilizados para praticar os métodos da presente invenção, como aqui descrito.

[00177] Os polinucleotídeos compreendem sequências de nucleotídeos que têm um grau de identidade com a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO: 13 de preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 65%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 75%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%,

ainda mais preferivelmente pelo menos 90%, muito mais preferivelmente pelo menos 95%, e ainda muito mais preferivelmente pelo menos 96%, 97%, 98%, ou 99%, que codificam um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora.

[00178] Em um aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pEJG120 que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30699. Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pEJG120 que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30699. A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 1 em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 1 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 2 que têm atividade celulolítica intensificadora..

[00179] Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 3. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pTter61C que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30813. Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 3. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61C que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30813. A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam

um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 3 em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 3 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 4 que têm atividade celulolítica intensificadora.

[00180] Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 5. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pTter61D que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30812. Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 5. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61D que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30812. A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 5 em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 5 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 6 que têm atividade celulolítica intensificadora..

[00181] Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 7. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pTter61E que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30814. Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 7. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61E que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30814. A

presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 7 em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 7 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 8 que têm atividade celulolítica intensificadora.

[00182] Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 9. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pTter61G que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30811. Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 9. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTter61G que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30811. A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 9 em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 9 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 10 que têm atividade celulolítica intensificadora.

[00183] Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 11. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pDZA2-7 que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30704. Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 11. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em

plasmídeo pDZA2-7 que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30704. A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 11 em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 11 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 12 que têm atividade celulolítica intensificadora.

[00184] Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste de SEQ ID NO: 13. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência contida em plasmídeo pTr3337 que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30878. Em outro aspecto preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 13. Em outro aspecto mais preferido, a sequência de nucleotídeos compreende ou consiste da sequência codificadora de polipeptídeo maduro contida em plasmídeo pTr3337 que está contido em *Escherichia coli* NRRL B-30878. A presente invenção também inclui sequências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 ou o seu polipeptídeo maduro, que difere de SEQ ID NO: 13 ou a sua sequência codificadora de polipeptídeo maduro em virtude da degeneração do código genético. A presente invenção também se refere às subsequências de SEQ ID NO: 13 que codificam fragmentos de SEQ ID NO: 14 que têm atividade celulolítica intensificadora.

[00185] A presente invenção também se refere aos polinucleotídeos mutantes compreendendo pelo menos uma mutação na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO: 13, na qual a sequência de nucleotídeos mutante codifica o polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, ou SEQ ID NO:

10, SEQ ID NO: 12, ou SEQ ID NO: 14. Em um aspecto preferido, o polipeptídeo maduro é aminoácidos 20 a 326 de SEQ ID NO: 2, aminoácidos 18 a 240 de SEQ ID NO: 4, aminoácidos 20 a 258 de SEQ ID NO: 6, aminoácidos 19 a 226 de SEQ ID NO: 8, ou aminoácidos 20 a 304 de SEQ ID NO: 10, aminoácidos 23 a 250 de SEQ ID NO: 12, ou aminoácidos 20 a 249 de SEQ ID NO: 14. Em outro aspecto preferido, a sequência codificadora de polipeptídeo maduro é de nucleotídeos 388 a 1332 de SEQ ID NO: 1, nucleotídeos 98 a 821 de SEQ ID NO: 3, nucleotídeos 126 a 978 de SEQ ID NO: 5, nucleotídeos 55 a 678 de SEQ ID NO: 7, nucleotídeos 58 a 912 de SEQ ID NO: 9, nucleotídeos 67 a 796 de SEQ ID NO: 11, ou nucleotídeos 77 a 766 de SEQ ID NO: 13.

[00186] Como descrito inicialmente, as técnicas usadas para isolar ou clonar um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo são conhecidas na arte e incluem isolamento de DNA genômico, preparação de cDNA, ou uma combinação das mesmas.

[00187] O polinucleotídeo também pode ser um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora que hibridiza sob condições de estringência pelo menos muito baixa, preferivelmente condições de estringência pelo menos baixa, mais preferivelmente condições de estringência pelo menos média, mais preferivelmente condições de estringência pelo menos média-alta, ainda mais preferivelmente condições de estringência pelo menos alta, e muito mais preferivelmente condições de estringência pelo menos muito alta com (i) a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, ou SEQ ID NO: 13, (ii) a sequência de cDNA contida na sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, ou SEQ ID NO: 11, ou a sequência de DNA genômico compreendendo a sequência codificadora de polipeptídeo maduro de SEQ ID NO: 7, SEQ ID

NO: 9, ou SEQ ID NO: 13, ou (iii) uma fita complementar de comprimento total de (i) ou (ii); ou suas variantes alélicas e subsequências (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), como aqui definidas. Em um aspecto preferido, a sequência codificadora de polipeptídeo maduro é de nucleotídeos 388 a 1332 de SEQ ID NO: 1, nucleotídeos 98 a 821 de SEQ ID NO: 3, nucleotídeos 126 a 978 de SEQ ID NO: 5, nucleotídeos 55 a 678 de SEQ ID NO: 7, nucleotídeos 58 a 912 de SEQ ID NO: 9, nucleotídeos 67 a 796 de SEQ ID NO: 11, ou nucleotídeos 77 a 766 de SEQ ID NO: 13.

Construtos de ácido nucleico

[00188] A Um polinucleotídeo isolado codificador de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, ou um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica podem ser manipulados em uma variedade de maneiras para proporcionar a expressão do polipeptídeo pela construção de um construto de ácido nucleico compreendendo um polinucleotídeo isolado codificador do polipeptídeo operacionalmente ligado em uma ou mais (várias) sequências de controle que dirigem a expressão da sequência codificadora em uma célula hospedeira adequada sob condições compatíveis com as sequências de controle. Manipulação da sequência de polinucleotídeo antes de sua inserção em um vetor pode ser desejável ou necessária dependendo do vetor de expressão. As técnicas para modificar sequências de polinucleotídeos utilizando métodos de DNA recombinante são bem conhecidas na arte.

[00189] A sequência de controle pode ser uma sequência de promotor apropriada, uma sequência de nucleotídeos que é reconhecida por uma célula hospedeira para expressão de um polinucleotídeo codificador de um tal polipeptídeo. A sequência de promotor contém sequências de controle de transcrição que medeiam a expressão do polipeptídeo. O promotor pode ser qualquer sequência de nucleotídeos que mostra atividade transcricional na célula hospedeira de escolha incluindo promotores mutantes, truncados, e híbridos, e pode ser obtido de genes codificadores de polipeptídeos

extracelulares ou intracelulares quer homólogos quer heterólogos para a célula hospedeira.

[00190] Exemplos de promotores adequados para dirigir a transcrição dos construtos de ácido nucleico, especialmente em uma célula hospedeira bacteriana, são os promotores obtidos do operon *lac* de *E. coli*, gene de agarase (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, gene de levansucrase (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, gene de alfa-amilase (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gene de amilase maltogênica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, gene de alfa-amilase (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gene de penicilinase (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, genes de *xylA* e *xylB* de *Bacillus subtilis*, e gene de beta-lactamase procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731), bem como o promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25). Outros promotores são descritos em "Useful proteins from recombinant bacteria" em *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; e em Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

[00191] Exemplos de promotores adequados para dirigir a transcrição dos construtos de ácido nucleico em uma célula hospedeira fúngica filamentosa são promotores obtidos dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilase estável a ácido de *Aspergillus niger*, glicoamilase (*glaA*) de *Aspergillus niger* ou *Aspergillus awamori*, lipase de *Rhizomucor miehei*, protease alcalina de *Aspergillus oryzae* triose fosfato isomerase de *Aspergillus oryzae*, acetamidase de *Aspergillus nidulans*, amiloglicosidase de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), tripsina-semelhante protease de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glicosidase de *Trichoderma reesei*, celobioidrolase I de *Trichoderma reesei*, celobioidrolase II de *Trichoderma reesei*, endoglicanase

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

[00192] Em uma levedura hospedeira, promotores úteis são obtidos dos genes para enolase (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactoquinase (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, álcool desidrogenase/gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triose fosfate isomerase (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae*, e 3-fosfoglicerato quinase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outros promotores úteis para células hospedeiras de levedura são descritos por Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488.

[00193] A sequência de controle também pode ser uma sequência de terminador de transcrição adequada, uma sequência reconhecida pela célula hospedeira para terminar a transcrição. A sequência de terminados está operacionalmente ligada na terminação 3' da sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo. Qualquer terminador que é funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usada na presente invenção.

[00194] Terminadores preferidos para células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidas dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*, alfa-glicosidase de *Aspergillus niger*, e tripsina-semelhante protease de *Fusarium oxysporum*.

[00195] Terminadores preferidos para células hospedeiras de levedura são obtidos dos genes para enolase de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, e gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outros terminadores úteis para células hospedeiras de levedura são descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[00196] A sequência de controle também pode ser uma sequência líder adequada, uma região não-traduzida de um mRNA que é importante para tradução pela célula hospedeira. A sequência líder está operacionalmente ligada na terminação 5' da sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo. Qualquer sequência líder que é funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usada na presente invenção.

[00197] Líderes preferidos para células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidos dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae* e triose fosfato isomerase de *Aspergillus nidulans*.

[00198] Líderes adequados para células hospedeiras de levedura são obtidos dos genes para enolase (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinase de *Saccharomyces cerevisiae*, fator-alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, e álcool desidrogenase/gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

[00199] A sequência de controle também pode ser uma sequência de poliadenilação, uma sequência operacionalmente ligada na terminação 3' da sequência de nucleotídeos e, quando transcrita, é reconhecida pela célula hospedeira como um sinal para adicionar resíduos de poliadenosina em mRNA transcrito. Qualquer sequência de poliadenilação que é funcional na célula hospedeira de escolha pode ser usada na presente invenção.

[00200] Sequências de poliadenilação preferidas para células hospedeiras fúngicas filamentosas são obtidas dos genes para TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*, tripsina-semelhante protease de *Fusarium oxysporum*, e alfa-glicosidase de *Aspergillus niger*..

[00201] Sequências de poliadenilação úteis para células hospedeiras de

levedura são descritas por Guo e Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[00202] A sequência de controle também pode ser uma sequência codificadora de peptídeo de sinal que codifica uma sequência de aminoácidos ligada na terminação amino de um polipeptídeo e dirige o polipeptídeo codificado na rota secretória da célula. A extremidade 5' da sequência codificadora da sequência de nucleotídeos pode inerentemente conter uma sequência codificadora de peptídeo de sinal naturalmente ligada em matriz de leitura de tradução com o segmento da sequência codificadora que codifica o polipeptídeo secretado. Alternativamente, a extremidade 5' da sequência codificadora pode conter uma sequência codificadora de peptídeo de sinal que é estranha à sequência codificadora. A sequência codificadora de peptídeo de sinal estranha pode ser exigida onde a sequência codificadora naturalmente não contém uma sequência codificadora de peptídeo de sinal. Alternativamente, a sequência codificadora de peptídeo de sinal estranha pode simplesmente substituir a sequência codificadora de peptídeo de sinal natural com o propósito de intensificar a secreção do polipeptídeo. Contudo, qualquer sequência codificadora de peptídeo de sinal que dirige o polipeptídeo expressado na rota secretória da célula hospedeira de escolha, *i.e.*, secretado em um meio de cultura, pode ser usada na presente invenção.

[00203] Sequências codificadoras de peptídeo de sinal eficazes para células hospedeiras bacterianas são as sequências codificadoras de peptídeo de sinal obtidas dos genes para amilase maltogênica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilase de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamase de *Bacillus licheniformis*, proteases neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus*, e *prsA* de *Bacillus subtilis*. Outros peptídeos de sinal são descritos por Simonen e Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

[00204] Regiões codificadoras de peptídeo de sinal eficazes para

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

[00205] Em um aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste dos aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 2. Em outro aspecto preferido, a região codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 330 a 387 de SEQ ID NO: 1.

[00206] Em outro aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste dos aminoácidos 1 a 17 de SEQ ID NO: 4. Em outro aspecto preferido, a região codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 47 a 97 de SEQ ID NO: 3.

[00207] Em outro aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste da região codificadora de aminoácidos que é aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 6. Em outro aspecto preferido, a região codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 69 a 125 de SEQ ID NO: 5.

[00208] Em outro aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste dos aminoácidos 1 a 18 de SEQ ID NO: 8. Em outro aspecto preferido, a região codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 1 a 54 de SEQ ID NO: 7.

[00209] Em outro aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste dos aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 10. Em outro aspecto preferido, a região codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 1 a 57 de SEQ ID NO: 9.

[00210] Em outro aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste dos aminoácidos 1 a 22 de SEQ ID NO: 12. Em outro aspecto

preferido, a região codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 1 a 66 de SEQ ID NO: 11.

[00211] Em outro aspecto preferido, o peptídeo de sinal compreende ou consiste dos aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID NO: 14. Em outro aspecto preferido, a região codificadora de peptídeo de sinal compreende ou consiste de nucleotídeos 20 a 76 de SEQ ID NO: 13.

[00212] Peptídeos de sinal úteis para células hospedeiras de levedura são obtidos dos genes para fator-alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Outras sequências codificadoras de peptídeo de sinal úteis são descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[00213] A sequência de controle também pode ser uma sequência codificadora de propeptídeo que codifica uma sequência de aminoácidos posicionada na terminação amino de um polipeptídeo. O polipeptídeo resultante é conhecido como uma proenzima ou um propolipeptídeo (ou um zimógeno em alguns casos). Um propolipeptídeo é geralmente inativo e pode ser convertido em um polipeptídeo ativo maduro por clivagem catalítica ou autocatalítica do propeptídeo do propolipeptídeo. A sequência codificadora de propeptídeo pode ser obtida dos genes para protease alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, protease neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, fator-alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, e lacase de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[00214] Onde ambas as sequências de peptídeo de sinal e de propeptídeo estão presentes na terminação amino de um polipeptídeo, a sequência de propeptídeo está posicionada ao lado da terminação amino de um polipeptídeo e a sequência de peptídeo de sinal está posicionada ao lado da terminação amino da região de propeptídeo.

[00215] Também pode ser desejável adicionar sequências regulatórias que permitem a regulação da expressão do polipeptídeo relativa ao crescimento da célula hospedeira. Exemplos de sistemas regulatórios são

aqueles que causam ligação e desligamento da expressão do gene em resposta a um estímulo químico ou físico, incluindo a presença de um composto regulatório. Sistemas regulatórios em sistemas procarióticos incluem os sistemas de operadores *lac*, *tac*, e *trp*. Em levedura, o sistema ADH2 ou o sistrma GAL1 podem ser usados. Em fungos filamentosos, o promotor de TAKA alfa-amilase, o promotor de glicoamilase de *Aspergillus niger*, e o promotor de glicoamilase de *Aspergillus oryzae* que podem ser usados como sequências regulatórias. Outros exemplos de sequência regulatórias são aqueles que permitem a amplificação de gene. Em sistemas eucarióticos, estas sequências regulatórias incluem o gene de di-hidrofolato redutase que é amplificado na presença de metotrexato, e os genes de metalotioneína que são amplificados com metais pesados. Nestes casos, a sequência de nucleotídeos codificadora do polipeptídeo estaria operacionalmente ligada na sequência regulatória.

Vetores de expressão

[00216] Os vários ácidos nucleicos e as várias sequências de controle aqui descritos(as) podem ser unidos juntos para produzir um vetor de expressão recombinante compreendendo um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora, ou um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica, um promotor, e sinais de terminação de transcrição e de tradução. Os vetores de expressão podem incluir um ou mais sítios de restrição convenientes para permitir inserção ou substituição da sequência de polinucleotídeo codificadora do polipeptídeo em tais sítios. Alternativamente, um polinucleotídeo codificador de um tal polipeptídeo pode ser expressado pela inserção da sequência de polinucleotídeo ou de um construto de ácido nucleico compreendendo a sequência em um vetor de expressão apropriado para a expressão. Na criação do vetor de expressão, a sequência codificadora está localizada no vetor de tal modo que a sequência codificadora esteja operacionalmente ligada com as

sequências de controle apropriadas para expressão.

[00217] O vetor de expressão recombinante pode ser qualquer vetor (*e.g.*, um plasmídeo ou vírus) que pode ser convenientemente submetido aos procedimentos de DNA recombinante e pode ocasionar expressão da sequência de polinucleotídeo. A escolha do vetor tipicamente dependerá da compatibilidade do vetor com a célula hospedeira na qual o vetor é para ser introduzido. Os vetores podem ser plasmídeos circulares fechados ou lineares.

[00218] O vetor pode ser um vetor de replicação autônoma, *i.e.*, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, cuja replicação é independente de replicação cromossômica, *e.g.*, um plasmídeo, um elemento extracromossômico, um minicromossomo, ou um cromossomo artificial. O vetor pode conter qualquer meio para assegurar auto-replicação. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado junto com o(s) cromossomo(s) no(s) quail(ais) ele tem estado integrado. Ademais, um plasmídeo ou vetor único ou dois ou mais plasmídeos ou vetores que juntos contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula hospedeira, ou um transposon podem ser usados..

[00219] Os vetores preferivelmente contêm um ou mais marcadores selecionáveis que permitem fácil seleção de células transformadas, transfectadas, transduzidas, ou células semelhantes. Um marcador selecionável é um gene cujo produto proporciona resistência a biocia ou viral, resistência a metais pesados, fototrofia a auxotrofos, e semelhante.

[00220] Exemplos de marcadores selecionáveis bacterianos são os genes *dal* genes de Bacillus *subtilis* ou *Bacillus licheniformis*, ou marcadores que concedem resistência a antibiótico tais como resistência à ampicilina, canamicina, cloranfenicl, ou tetraciclina. Marcadores adequados para células hospedeiras de levedura são ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, e URA3. Marcadores selecionáveis para uso em uma célula hospedeira fúngica

filamentosa incluem, mas não são limitados a, *amdS* (acetamidase), *argB* (ornitina carbamoiltransferase), *bar* (fosfinotricina acetiltransferase), *hph* (higromicina fosfotransferase), *niaD* (nitrato redutase), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilase), *sC* (sulfato adeniltransferase), e *trpC* (antranilato sintase), bem como seus equivalentes. Preferidos para uso em uma célula de *Aspergillus* são os genes *amdS* e *pyrG* de *Aspergillus nidulans* ou *Aspergillus oryzae* o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[00221] Os vetores preferivelmente contêm um elemento(s) que permite integração do vetor no genoma da célula hospedeira ou replicação autônoma do vetor na célula independente do genoma.

[00222] Para integração no genoma da célula hospedeira, o vetor pode se basear na sequência de polinucleotídeo codificador do polipeptídeo ou em qualquer outro elemento do vetor para integração no genoma por recombinação homóloga ou não-homóloga. Alternativamente, o vetor pode conter sequências de nucleotídeos adicionais para dirigir integração por recombinação homóloga no genoma da célula hospedeira em localização(ões) precisa(s) no(s) cromossomo(s). Para aumentar a possibilidade de integração em uma localização precisa, os elementos de integração devem preferivelmente conter um número suficiente de ácidos nucleicos, tais como 100 a 10,000 pares de bases, preferivelmente 400 a 10,000 pares de bases, e muito mais preferivelmente 800 a 10,000 pares de bases, que têm um alto grau de identidade com a sequência alvo correspondente para intensificar a probabilidade de recombinação homóloga. Os elementos de integração podem ser qualquer sequência que é homóloga à sequência alvo no genoma da célula hospedeira. Ademais, os elementos de integração podem ser sequências de nucleotídeos não-codificadoras ou codificadoras. Por outro lado, o vetor pode estar integrado no genoma da célula hospedeira por recombinação não-homóloga.

[00223] Para replicação autônoma, o vetor pode adicionalmente

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

[00224] Exemplos de origens de replicação bacterianas são as origens de replicação de plasmídeos pBR322, pUC19, pACYC177, e pACYC184 permitindo replicação em *E. coli*, e pUB110, pE194, pTA1060, e pAMß1 permitindo replicação em *Bacillus*.

[00225] Exemplos de origens de replicação para uso em uma célula hospedeira de levedura são a origem de replicação de 2 micrômetros, ARS1, ARS4, a combinação de ARS1 e CEN3, e a combinação de ARS4 e CEN6.

[00226] Exemplos de origens de replicação úteis em uma célula fúngica filamentosa são AMA1 e ANS1 (Gems *et al.*, 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163-9175; WO 00/24883). Isolamento do gene AMA1 e construção de plasmídeos ou vetores compreendendo o gene podem ser realizados de acordo com os métodos revelados em WO 00/24883.

[00227] Mais do que uma cópia de um polinucleotídeo codificador de um tal polipeptídeo pode ser inserida na célula hospedeira para aumentar a produção do polipeptídeo. Um aumento no número de cópias do polinucleotídeo pode ser obtido por integração pelo menos de uma cópia adicional da sequência no genoma da célula hospedeira ou por inclusão de um gene marcador selecionável amplificável com o polinucleotídeo onde células contendo cópias amplificadas do gene marcador selecionável, e deste modo cópias adicionais do polinucleotídeo, podem ser selecionadas por cultivo de células na presença do agente selecionável apropriado.

[00228] Os procedimentos usados para ligar os elementos descritos

acima para construir os vetores de expressão recombinantes são bem conhecidos por uma pessoa experiente na arte (veja, *e.g.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células hospedeiras

[00229] Células hospedeiras recombinantes compreendendo um polinucleotídeo codificador de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora ou um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica podem ser vantajosamente usadas na produção recombinante do polipeptídeo. Um vetor compreendendo um tal polinucleotídeo é introduzido em uma célula hospedeira de modo que o vetor seja mantido como um integrante cromossômico ou como vetor extra-cromossômico auto-replicante como descrito no início. O termo "célula hospedeira" inclui qualquer progênie de uma célula parental que não é idêntica à célula parental devido às mutações que ocorrem durante replicação. A escolha de uma célula hospedeira em uma grande extensão dependerá do gene codificador do polipeptídeo e de sua fonte.

[00230] A célula hospedeira pode ser um microorganismo unicelular, e.g., um procarioto, ou um microorganismo não-unicelular, *e.g.*, um eucarioto.

[00231] A célula hospedeira bacteriana pode ser qualquer bactéria Gram-positiva ou uma bactéria Gram-negativa. Bactérias Gram-positivas incluem, mas não são limitadas a, *Bacillus*, *Streptococcus, Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, e *Oceanobacillus*. G Bactérias Gram-negativas incluem, mas não são limitadas a, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, e *Ureaplasma*.

[00232] A célula hospedeira bacteriana pode ser qualquer célula de *Bacillus*. Células de Bacillus úteis na prática da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, células de *Bacillus alkalophilus, Bacillus*

amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, *Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis*, e *Bacillus thuringiensis*.

[00233] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus subtilis*. Em um aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus clausii*. Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus licheniformis*. Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Bacillus subtilis*.

[00234] A célula hospedeira bacteriana também pode ser qualquer célula de *Streptococcus*. Células de *Streptococcus* úteis na prática da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, células de *Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis,* e *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[00235] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus equisimilis*. Em outro aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus pyogenes*. Em outro aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus uberis*. Em outro aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[00236] A célula hospedeira bacteriana também pode ser qualquer célula de *Streptomyces*. Células de *Streptomyces* úteis na prática da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, e *Streptomyces lividans*.

[00237] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces achromogenes*. Em outro aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces avermitilis*. Em outro aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces coelicolor*. Em outro aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces griseus*. Em outro aspecto preferido, a célula hospedeira bacteriana é uma célula de *Streptomyces lividans*.

[00238] A introdução de DNA em uma célula de *Bacillus* pode, por exemplo, ser realizada por transformação de protoplasto (veja, *e.g.*, Chang e Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), pelo uso de células competentes (veja, *e.g.*, Young e Spizizen, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, ou Dubnau e Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), por eletroporação (veja, *e.g.*, Shigekawa e Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), ou por conjugação (veja, *e.g.*, Koehler e Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5271-5278). A introdução de DNA em uma célula de *E coli* pode, por exemplo, ser realizada por transformação de, protoplasto (veja, *e.g.*, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) ou eletroporação (veja, *e.g.*, Dower *et al.*, 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145). A introdução de DNA em uma célula de *Streptomyces* pode, por exemplo, ser realizada por transformação de protoplasto e eletroporação (veja, *e.g.*, Gong *et al.*, 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), por conjugação (veja, *e.g.*, Mazodier *et al.*, 1989, *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585), ou por transdução (veja, *e.g.*, Burke *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294). A introdução de DNA em uma célula de *Pseudomonas* pode, por exemplo, ser realizada por eletroporação (veja, *e.g.*, Choi *et al.*, 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) ou por conjugação (veja, *e.g.*, Pinedo e Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 51-57). A introdução de DNA em uma célula de *Streptococcus* pode, por exemplo, ser realizada por competência natural (veja, *e.g.*, Perry e Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32:

1295-1297), por transformação de protoplasto (veja, *e.g.*, Catt e Jollick, 1991, *Microbios.* 68: 189-2070, por eletroporação (veja, *e.g.*, Buckley *et al.*, 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3800-3804) ou por conjugação (veja, *e.g.*, Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45: 409-436). Contudo, qualquer método conhecido na arte para introduzir DNA em uma célula hospedeira pode ser usado.

[00239] A célula hospedeira também pode ser um eucarioto, tal como uma célula de mamífero, de inseto, de planta, ou de fungo.

[00240] Em um aspecto preferido, a célula hospedeira é uma célula de fungo. “Fungos” como aqui usado inclui os filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, e Zygomycota (como definidos por Hawksworth *et al.*, *em*, *Ainsworth and Bisby’s Dictionary of The Fungi*, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) bem como os Oomycota (como citados em Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, página 171) e todos fungos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

[00241] Em um aspecto mais preferido, a célula hospedeira fúngica é uma célula de levedura. "Levedura" como aqui usado inclui levedura ascosporogênica (Endomycetales), levedura basidiosporogênica, e levedura pertencente aos Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Visto que a classificação de levedura pode mudar no futuro, para os propósitos desta invenção, levedura deve ser definida como descrito em *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., e Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series* No. 9, 1980).

[00242] Em um aspecto ainda mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia*.

[00243] Em um aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*,

Saccharomyces kluyveri, *Saccharomyces norbensis*, ou *Saccharomyces oviformis*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Kluyveromyces lactis*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira de levedura é uma célula de *Yarrowia lipolytica*.

[00244] Em outro aspecto mais preferido, a célula hospedeira fúngica é uma célula fúngica filamentosa. “Fungos filamentosos” incluem todas as formas filamentosas das subdivisões Eumycota e Oomycota (como definidas por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Os fungos filamentosos são geralmente caracterizados por uma parece micelial composta de quitina, celulose, glicano, quitosana, manana, e outros polissacarídeos complexos. Crescimento vegetativo é por alongamento hifal e catabolismo de carbono é obrigatoriamente aeróbico. Em contraste, crescimento vegetativo por leveduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* é por germinação de um talo unicelular e catabolismo de carbono pode ser fermentativo.

[00245] Em um aspecto ainda mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, ou *Trichoderma*.

[00246] Em um aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus oryzae*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium*

culmorum, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, ou *Fusarium venenatum*. Em outro aspecto muito mais preferido, a célula hospedeira fúngica filamentosa é uma célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, ou *Trichoderma viride*.

[00247] Células fúngicas podem ser transformadas por um processo envolvendo formação de protoplasto, transformação dos protoplastos, e regeneração da parede celular em uma maneira *per se* conhecida. Procedimentos adequados para transformação de células hospedeiras de *Aspergillus* e *Trichoderma* são descritos em EP 238.023 e Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Métodos adequados para transformar espécie *Fusarium* são descritos por Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156, e WO 96/00787. Levedura pode ser transformada usando os procedimentos descritos por Becker e Guarente, em Abelson, J.N. e Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology*, Volume 194, pp 182-187, Academic Press,

Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; e Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

Métodos de produção

[00248] Métodos para produzir um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora ou um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica, compreendem (a) cultivar uma célula, que em sua forma de tipo selvagem é capaz de produzir o polipeptídeo, sob condições que conduzem à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[00249] Alternativamente, métodos para produzir um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora ou um polipeptídeo tendo atividade de enzima celulolítica, compreendem (a) cultivar uma célula hospedeira recombinante sob condições que conduzem à produção do polipeptídeo; e (b) recuperar o polipeptídeo.

[00250] Nos métodos de produção, as células são cultivadas em um meio nutriente adequado para produção do polipeptídeo usando métodos bem conhecidos na arte. Por exemplo, a célula pode ser cultivada por cultivo em frasco agitado, e fermentação em escala pequena ou em escala grande (incluindo fermentações contínua, em batelada, batelada-alimentada, ou no estado sólido) em fermentadores de laboratório ou industriais realizada em um meio adequado e sob condições que permitem que o polipeptídeo seja expressão e/ou isolado. O cultivo ocorre em um meio nutriente adequado compreendendo fontes de carbono e de nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na arte. Meios adequados estão disponíveis em fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (*e.g.*, em catálogos da American Type Culture Collection). Se o polipeptídeo é secretado para dentro do meio nutriente, o polipeptídeo pode ser recuperado diretamente do meio. Se o polipeptídeo não pe secretado para dentro do meio, ele pode ser recuperado dos lisados de células.

[00251] Os polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora ou atividade de enzima celulolítica são detectados usando os métodos aqui descritos.

[00252] O caldo resultante pode ser usado como tal ou o polipeptídeo pode ser recuperado usando métodos conhecidos na arte. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser recuperado do meio nutriente por procedimentos convencionais incluindo, mas não limitados a, centrifugação, filtração, extração, secagem por pulverização, evaporação, ou precipitação.

[00253] Os polipeptídeos podem ser purificados por uma variedade de procedimentos conhecidos na arte incluindo, mas não limitado a, cromatografia (*e.g.*, troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização, e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (*e.g.*, focalização isoelétrica preparativa), solubilidade diferencial (*e.g.*, precipitação por sulfato de amônio), SDS-PAGE, ou extração (veja, *e.g.*, *Protein Purification*, J.-C. Janson e Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obter polipeptídeos substancialmente puros.

Métodos para processar material contendo celulose

[00254] As composições e os métodos da presente invenção podem ser usados para hidrolisar (sacarificar) um material contendo celulose, *e.g.*, lignocelulose, em açúcares fermentáveis e converter os açúcares fermentáveis em muitas substâncias úteis, *e.g.*, compostos químicos e combustíveis. A produção de um produto de fermentação desejado a partir do material contendo celulose tipicamente envolve pré-tratamento, hidrólise enzimática (sacarificação), e fermentação.

[00255] O processamento de material contendo celulose de acordo com a presente invenção pode ser realizado usando processos conhecidos na arte. Além disso, os métodos da presente invenção podem ser implementados usando qualquer aparelho de processamento de biomassa configurado para operar de acordo com a invenção.

[00256] Hidrólise (sacarificação) e fermentação, separadas ou simultâneas, incluem, mas não são limitadas a, hidrólise e fermentação separadas (SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF), hidrólise e fermentação híbridas (HHF), SHCF (hidrólise e co-fermentação separadas), HHCF (hidrólise e fermentação híbridas), e conversão microbiana direta (DMC). É aqui entendido que qualquer método na arte compreendendo pré-tratamento, hidrólise (sacarificação) enzimática, fermentação, ou uma combinação das mesmas, pode ser usado na prática dos métodos da presente invenção.

[00257] Um aparelho convencional pode incluir um reator agitado de batelada alimentada, um reator agitado de batelada, um reator agitado de fluxo contínuo com ultrafiltração, e/ou um reator de coluna de fluxo plugado contínuo (Fernanda de Castilhos Corazza, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin e Ivo Neitzel, 2003, "Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis", *Acta Scientiarum. Technology* 25: 33-38; Gusakov, A. V., e Sinitsyn, A. P., 1985, "Kinetics of the enzymatic hydrolysis of celulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process", *Enz. Microb. Technol.* 7: 346-352), um reator de atrição (Ryu, S. K., e Lee, J. M., 1983, "Bioconversion of waste celulose by using an attrition bioreactor", *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65), ou um reator com agitação intensiva induzida por um campo eletromagnético (Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, "Enhancement of enzymatic celulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 141-153). Tipos de reator adicionais incluem, por exemplo, reatores de leito fluidizado, de manta de fluxo ascendente, imobilizado, e do tipo de extrusor para hidrólise e/ou fermentação.

[00258] Pré-tratamento. Na prática dos métodos da presente invenção, qualquer processo de pré-tratamento conhecido na arte pode ser usado para

disruptar os componentes de parede celular de planta do material contendo celulose. O material contendo celulose também pode ser submetido ao pré-embebimento, umectação, ou condicionamento antes do pré-tratamento usando métodos conhecidos na arte. Pré-tratamentos convencionais incluem, mas não são limitados a, pré-tratamento com vapor (com ou sem explosão), pré-tratamento com ácido diluído, pré-tratamento com água quente, pré-tratamento com cal, oxidação úmida, explosão úmida, explosão de fibra de amônia, pré-tratamento com solvente orgânico, e pré-tratamento biológico. Pré-tratamentos adicionais incluem ultra-som, eletroporação, microondas, CO_2 supercrítico H_2O supercrítica, e percolação com amônia.

[00259] O material contendo celulose pode ser pré-tratado antes da hidrólise e/ou da fermentação. Pré-tratamento é preferivelmente realizado antes da hidrólise. Alternativamente, o pré-tratamento pode ser realizado simultaneamente com hidrólise, tal como simultaneamente com tratamento do material contendo celulose com uma ou mais enzimas celulolíticas, ou outras atividades de enzima, para liberar açúcares fermentáveis, tais como glicose e/ou maltose. Na maioria dos casos a própria etapa de pré-tratamento resulta em alguma conversão de biomassa em açúcares fermentáveis (mesmo em ausência de enzimas).

[00260] Pré-tratamento com vapor. Em pré-tratamento com vapor, o material contendo celulose é aquecido para disruptar os componentes de parede celular de planta, incluindo lignina, hemicelulose, e celulose para preparar a celulose e outras frações, *e.g.*, hemicelulase, acessível às enzimas. O material de celulose é passado para ou através de um vaso de reação onde vapor é injetado para aumentar a temperatura para a temperatura e a pressão exigidas e é lá retido pelo tempo de reação desejado. Pré-tratamento com vapor é preferivelmente feito a140-230°C, mais preferivelmente a 160-200°C, e muito mais preferivelmente a 170-190°C, onde a faixa de temperatura ótima depende da adição de um catalisador químico. Tempo de residência para o

pré-tratamento com vapor é preferivelmente de 1-15 minutos, mais preferivelmente 3-12 minutos, e muito mais preferivelmente 4-10 minutos, onde o tempo de residência médio depende da faixa de temperatura e da adição de um catalisador químico. Pré-tratamento com vapor permite carregamentos de sólidos elevadamente altos, de modo que o material contendo celulose é geralmente apenas umedecido durante o pré-tratamento. O pré-tratamento com vapor é muitas vezes combinado com uma descarga explosiva do material após o pré-tratamento, que é conhecida como explosão de vapor, isto é, expansão brusca rápida para pressão atmosférica e fluxo turbulento do material para aumentar a área superficial acessível pela fragmentação (Duff e Murray, 1996, *Bioresource Technology* 855: 1-33; Galbe e Zacchi, 2002, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 618-628; Pedito de Patente U.S. No. 20020164730).

[00261] Um catalisador tal como H_2SO_4 ou SO_2 (tipicamente 0,3 a 3% p/p) é muitas vezes adicionado antes do pré-tratamento com vapor, o que diminui o tempo e a temperatura, aumenta a recuperação, e melhora a hidrólise enzimática (Ballesteros *et al.*, 2006, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 496-508; Varga *et al.*, 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116: 509-523; Sassner *et al.*, 2006, *Enzyme Microb. Technol.* 39: 756-762).

[00262] Pré-tratamento químico: O termo "tratamento químico" refere-se a qualquer pré-tratamento químico que promove a separação e/ou liberação de celulose, hemicelulose, e/ou lignina. Exemplos de processos de pré-tratamento químico adequados incluem, por exemplo, pré-tratamento com ácido diluído, pré-tratamento com cal, oxidação úmida, explosão por congelação / fibra de amônia (AFEX), percolação de amônia (APR), e pré-tratamentos com solvente orgânico.

[00263] Em pré-tratamento com ácido diluído, o material contendo celulose é misturado com ácido diluído, tipicamente H_2SO_4, e água para formar uma pasta fluida, aquecido por vapor para a temperatura desejada, e

após um tempo de residência é bruscamente expandido para a pressão atmosférica. O pré-tratamento com ácido diluído pode ser conduzido com numerosos projetos de reator, *e.g.*, reatores de fluxo plugado, reatores em contra-corrente, ou reatores de leito retrátil em contra-corrente contínuo (Duff e Murray, 1996, *supra*; Schell *et al.*, 2004, *Bioresource Technol.* 91: 179-188; Lee *et al.*, 1999, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 93-115).

[00264] Vários métodos de pré-tratamento sob condições alcalinas também podem ser usados. Estes pré-tratamentos alcalinos incluem, mas não são limitados a, pré-tratamento com cal, oxidação úmida, percolação de amônia (APR), e explosão por congelamento / fibra de amônia (AFEX).

[00265] Pré-tratamento com cal é realizado com carbonato de cálcio, hidróxido de sódio, ou amônia em temperaturas baixas de 85-150ºC e tempos de residência de 1 hora a vários dias (Wyman *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 1959-1966; Mosier *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 673-686). WO 2006/110891, WO 2006/11899, WO 2006/11900, e WO 2006/110901 revelam métodos de pré-tratamento usando amônia.

[00266] Oxidação úmida é um pré-tratamento térmico realizado tipicamente a 180-200ºC por 5-15 minutos com adição de um agente oxidante tal como peróxido de hidrogênio ou em sobre-pressão de oxigênio (Schmidt e Thomsen, 1998, *Bioresource Technol.* 64: 139-151; Palonen *et al.*, 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 1-17; Varga *et al.*, 2004, *Biotechnol. Bioeng.* 88: 567-574; Martin *et al.*, 2006, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1669-1677). O pré-tratamento é realizado preferivelmente em 1-40% de matéria seca, mais preferivelmente 2-30% de matéria seca, e muito mais preferivelmente 5-20% de matéria seca, e muitas vezes o pH inicial é aumentado pela adição de álcali tal como carbonato de sódio.

[00267] Uma modificação do método de pré-tratamento de oxidação úmida, conhecida como explosão úmida (combinação de oxidação úmida e explosão de vapor), pode manusear matéria seca até 30%. Em explosão

úmida, o agente oxidante é introduzido durante pré-tratamento após um certo tempo de residência. O pré-tratamento é então terminado por expansão brusca para pressão atmosférica (WO 2006/032282).

[00268] Explosão de fibra de amônia (AFEX) envolve tratamento de material contendo celulose com amônia líquida ou gasosa em temperaturas moderadas tal como 90-100ºC e pressão alta tal como 1,700-2,000 kPa por 5-10 minutos, onde o teor de matéria seca pode ser tão alto quanto 60% (Gollapalli *et al.*, 2002, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 23-35; Chundawat *et al.*, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 96: 219-231; Alizadeh *et al.*, 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121:1133-1141; Teymouri *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 2014-2018).

[00269] Pré-tratamento com solvente orgânico deslignifica o material contendo celulose por extração usando etanol aquoso (etanol 40-60%) a 160-200ºC por 30-60 minutos (Pan *et al.*, 2005, *Biotechnol. Bioeng.* 90: 473-481; Pan *et al.*, 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 94: 851-861; Kurabi *et al.*, 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121:219-230). Ácido sulfúrico é costumeiramente adicionado como um catalisador. Em pré-tratamento com solvente orgânico, a maior parte da hemicelulose é removida.

[00270] Outros exemplos de métodos de pré-tratamento adequados são descritos por Schell *et al.*, 2003, *Appl. Biochem. and Biotechnol.* Vol. 105-108, p. 69-85, e Mosier *et al.*, 2005, *Bioresource Technology* 96: 673-686, e Pedido Publicado U.S. 2002/0164730.

[00271] Em um aspecto, o pré-tratamento químico é preferivelmente realizado como um tratamento ácido, e mais preferivelmente como um tratamento contínuo com ácido diluído e/ou suave. O ácido é tipicamente ácido sulfúrico, mas outros ácidos também podem ser usados, tais como ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloreto de hidrogênio ou suas misturas. Tratamento com ácido suave é conduzido na faixa de pH de preferivelmente 1-5, mais

preferivelmente 1-4, e muito mais preferivelmente 1-3. Em um aspecto, a concentração de ácido está dentro da faixa de preferivelmente 0,01 a 20% em peso de ácido, mais preferivelmente 0,05 a 10% em peso de ácido, ainda mais preferivelmente 0,1 a 5% em peso de ácido, e muito mais preferivelmente 0,2 a 2,0% em peso de ácido. O ácido é contatado com o material contendo celulose e mantido em uma temperatura, por exemplo, dentro da faixa de 160-220ºC, preferivelmente 165-195ºC, por períodos variando de segundos a minutos a, *e.g.*, 1 segundo a 60 minutos.

[00272] Em outro aspecto, pré-tratamento é realizado como uma etapa de explosão de fibra de amônia (etapa de pré-tratamento AFEX).

[00273] Em outro aspecto, pré-tratamento ocorre em uma pasta fluida aquosa. Em aspectos preferidos, o material contendo celulose está presente durante pré-tratamento em quantidades preferivelmente entre 10 e 80% em peso, mais preferivelmente entre 20 e 70% em peso, e muito mais preferivelmente entre 30e 60% em peso, tal como ao redor de 50% em peso. O material contendo celulose pré-tratado pode ser não lavado ou lavado usando qualquer método conhecido na arte, *e.g.*, lavado com água.

[00274] Pré-tratamento mecânico: O termo "pré-tratamento mecânico" refere-se aos vários tipos de moagem ou trituração (*e.g.*, moagem seca, moagem úmida, ou moagem vibratória com bolas).

[00275] Pré-tratamento físico: O termo "pré-tratamento físico" refere-se a qualquer pré-tratamento que promove a separação e/ou liberação de celulose, hemicelulose, e/ou lignina do material contendo celulose. Por exemplo, pré-tratamento físico pode envolver irradiação (*e.g.*, irradiação de microondas), explosão com vapor / vaporização, hidrotermólise, e suas combinações.

[00276] Pré-tratamento físico pode envolver pressão alta e/ou temperatura alta (explosão com vapor). Em um aspecto, pressão alta significa pressão dentro da faixa de preferivelmente cerca de 2,068 a cerca de 4,137

kPa, mais preferivelmente cerca de 2,413 a cerca de 3,792 kPa, e muito mais preferivelmente cerca de 2,758 a cerca de 3,447 kPa, tal como ao redor de 3,103 kPa. Em outro aspecto, temperatura alta significa temperaturas dentro da faixa de cerca de 100 a cerca de 300ºC, preferivelmente cerca de 140 a cerca de 235ºC. Em um aspecto preferido, pré-tratamento mecânico é realizado em um processo em batelada, sistema hidrolisador de canhão de vapor que usa pressão alta e temperatura alta como definidas acima, *e.g.*, um Hidrolisador Sunds disponível na Sunds Defibrator AB, Suécia.

[00277] Pré-tratamento físico e químico combinado: O material contendo celulose pode ser pré-tratado tanto física quanto quimicamente. Por exemplo, a etapa de pré-tratamento pode envolver tratamento com ácido diluído ou suave e tratamento em pressão e/ou temperatura alta. Os pré-tratamentos físicos e químicos podem ser realizados sequencialmente ou simultaneamente, como desejado. Um pré-tratamento mecânico também pode ser incluído.

[00278] Conformemente, em um aspecto preferido, o material contendo celulose é submetido ao pré-tratamento mecânico, químico ou físico, ou qualquer combinação dos mesmos, para promover a separação e/ou liberação de celulose, hemicelulose e/ou lignina.

[00279] Pré-tratamento biológico: O termo "pré-tratamento" biológico refere-se a qualquer pré-tratamento biológico que promove a separação e/ou liberação de celulose, hemicelulose, e/ou lignina do material contendo celulose. Técnicas de pré-tratamento biológico podem envolver aplicação de microorganismos solubilizadores de lignina (veja, por exemplo, Hsu, T.-A., 1996, "Pretreatment of biomass", em *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh e Singh, 1993, "Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass", *Adv. Appl. Microbiol*. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, "Pretreating lignocellulosic

biomass: a review", em *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Himmel, M. E., Baker, J. O., e Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., e Tsao, G. T., 1999, "Ethanol production from renewable resources", en *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemanha, 65: 207-241; Olsson e Hahn-Hagerdal, 1996, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production", *Enz. Microb. Tech*. 18: 312-331; e Vallander e Eriksson, 1990, "Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art", *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol*. 42: 63-95).

[00280] Sacarificação. Na etapa de hidrólise, também conhecida como sacarificação, o material contendo celulose pré-tratado é hidrolisado para quebrar a celulose e alternativamente também hemicelulose em açúcares fermentáveis, tais como glicose, xilose, xilulose, arabinose, maltose, manase, galactose, e/ou oligossacarídeos solúveis. A hidrólise é realizada enzimaticamente usando uma composição de enzimas celulolíticas da presente invenção compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora e cátion de metal divalente ativador solúvel. Os componentes enzima da composição também podem ser adicionados sequencialmente.

[00281] Hidrólise enzimática é preferivelmente conduzida em um ambiente aquoso adequado sob condições que podem ser prontamente determinadas por uma pessoa experiente na arte. Em um aspecto preferido, hidrólise é realizada sob condições adequadas para atividade da(s) enzima(s), *i.e.*, ótimas para a(s) enzima(s)). A hidrólise pode ser realizada como um processo de batelada alimentada ou contínuo onde o material contendo celulose pré-tratado (substrato) é alimentado gradualmente em, por exemplo, uma solução de hidrólise contendo enzima.

[00282] A sacarificação é geralmente realizada em fermentadores ou reatores de tanque agitado sob condições controladas de pH, temperatura, e misturação. Condições adequadas de tempo, temperatura e pH de processo podem ser prontamente determinadas por uma pessoa experiente na arte. Por exemplo, a sacarificação pode demorar até 200 horas, mas é tipicamente realizada por preferivelmente cerca de 12 a cerca de 96 horas, mais preferivelmente cerca de 16 a cerca de 72 horas, e muito mais preferivelmente cerca de 24 a cerca de 48 horas. A temperatura está dentro da faixa de preferivelmente cerca de 25°C a cerca de 70°C, mais preferivelmente cerca de 30°C a cerca de 65°C, e mais preferivelmente cerca de 40°C to 60°C, em particular cerca de 50°C. O pH está dentro da faixa de preferivelmente cerca de 3 a cerca de 8, mais preferivelmente cerca de 3,5 a cerca de 7, e muito mais preferivelmente cerca de 4 a cerca de 6, em particular cerca de pH 5. O teor de sólidos secos está dentro da faixa de preferivelmente cerca de 5 a cerca de 50% em peso, mais preferivelmente cerca de 10 a cerca de 40% em peso, e muito mais preferivelmente cerca de 20 a cerca de 30% em peso.

[00283] As quantidades ótimas das enzimas e dos polipeptídeos tendo atividade celulolítica intensificadora dependem de vários fatores incluindo, mas não limitados a, a mistura de componentes proteínas celulolíticas, o substrato celulósico, a concentração de substrato celulósico, o(s) pré-tratamento(s) do substrato celulósico, a temperatura, o tempo, o pH, e a inclusão de organismo fermentador (*e.g.*, levedura para Sacarificação e Fermentação Simultâneas).

[00284] Em um aspecto preferido, uma quantidade eficaz de proteína(s) celulolítica(s) para material contendo celulose é cerca de 0,5 a cerca de 50 mg, preferivelmente a cerca de 0,5 a cerca de 40 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,5 a cerca de 25 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,75 a cerca de 20 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,75 a cerca de 15 mg, ainda mais preferivelmente a cerca de 0,5 a cerca de 10 mg, e muito mais

preferivelmente a cerca de 2,5 a cerca de 10 mg por g de material contendo celulose.

[00285] Em outro aspecto preferido, uma quantidade eficaz de um polipeptídeo tendo atividade celulolítica intensificadora para material contendo celulose é cerca de 0,5 a cerca de 50 mg, preferivelmente a cerca de 0,5 a cerca de 40 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,5 a cerca de 25 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,75 a cerca de 20 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,75 a cerca de 15 mg, ainda mais preferivelmente a cerca de 0,5 a cerca de 10 mg, e muito mais preferivelmente a cerca de 2,5 a cerca de 10 mg por g de material contendo celulose.

[00286] Em outro aspecto preferido, uma quantidade eficaz de polipeptídeo(s) tendo atividade celulolítica intensificadora para material contendo celulose é cerca de 0,01 a cerca de 50,0 mg, preferivelmente cerca de 0,01 a cerca de 40 mg, mais preferivelmente cerca de 0,01 a cerca de 30 mg, mais preferivelmente cerca de 0,01 a cerca de 20 mg, mais preferivelmente cerca de 0,01 a cerca de 10 mg, mais preferivelmente cerca de 0,01 a cerca de 5 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,025 a cerca de 1,5 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,05 a cerca de 1,25 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,075 a cerca de 1,25 mg, mais preferivelmente a cerca de 0,1 a cerca de 1,25 mg, ainda mais preferivelmente a cerca de 0,15 a cerca de 1,25 mg, e muito mais preferivelmente a cerca de 0,25 a cerca de 1,0 mg per g de material contendo celulose.

[00287] Em outro aspecto preferido, uma quantidade eficaz de polipeptídeo(s) tendo atividade celulolítica intensificadora para proteína(s) celulolítica(s) é cerca de 0,005 a cerca de 1,0 g, preferivelmente a cerca de 0,01 a cerca de 1,0 g, mais preferivelmente a cerca de 0,15 a cerca de 0,75 g, mais preferivelmente a cerca de 0,15 a cerca de 0,5 g, mais preferivelmente a cerca de 0,1 a cerca de 0,5 g, ainda mais preferivelmente a cerca de 0,1 a cerca de 0,5 g, e muito mais preferivelmente a cerca de 0,05 a cerca de 0,2 g

por g de proteína(s) celulolítica(s).

[00288] Fermentação. Os açúcares fermentáveis obtidos do material contendo celulose pré-tratado e hidrolisado podem ser fermentados por um ou mais microorganismos fermentadores capazes de fermentar os açúcares diretamente ou indiretamente em um produto de fermentação desejado. "Fermentação" ou "processo de fermentação refere-se a qualquer processo de fermentação ou qualquer processo compreendendo uma etapa de fermentação. Processos de fermentação também incluem processos de fermentação usados na indústria de biocombustível, indústria de álcool consumível (*e.g.*, cerveja e vinho), indústria de laticínios (*e.g.*, produtos lácteos fermentados), indústria de couro, e indústria de tabaco. As condições de fermentação dependem do produto de fermentação desejado e do organismo fermentador e podem ser facilmente determinadas por uma pessoa experiente na arte.

[00289] Na etapa de fermentação, açúcares liberados do material contendo celulose como um resultado das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, são fermentados para um produto, *e.g.*, etanol, por um organismo fermentador, tal como levedura. Hidrólise (sacarificação) e fermentação podem ser separadas ou simultâneas. Tais métodos incluem, mas não são limitados a, hidrólise e fermentação separadas (SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF), hidrólise e fermentação híbridas (HHF), SHCF (hidrólise e co-fermentação separadas), HHCF (hidrólise e fermentação híbridas), e conversão microbiana direta (DMC).

[00290] Qualquer material contendo celulose hidrolisado adequado pode ser usado na etapa de fermentação na prática da presente invenção. O material é geralmente selecionado baseado no produto de fermentação desejado, *i.e.*, a substância a ser obtida da fermentação, e o processo utilizado, como é bem conhecido na arte.

[00291] O termo "meio de fermentação" é aqui entendido para se

referir a um meio antes do(s) microorganismo(s) fermentador(es) ser(em) adicionado(s), tal como, um meio resultante de um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

[00292] "Microorganismo fermentador" refere-se a qualquer microorganismo, incluindo organismos bacterianos e fúngicos, adequados para uso em um processo de fermentação desejado para produzir um produto de fermentação. O organismo fermentador pode ser os organismos fermentadores de C_6 e/ou C_5, ou uma sua combinação. Ambos organismos fermentadores de C_6 e C_5 são bem conhecidos na arte. Tais organismos fermentadores adequados são capazes de fermentar, *i.e.*, converter, açúcares, tais como glicose, xilose, xilulose, arabinose, maltose, manose, galactose, ou oligossacarídeos, direta ou indiretamente no produto de fermentação desejado.

[00293] Exemplos de organismos fermentadores bacterianos e fúngicos produtores de etanol são descritos por Lin *et al.*, 2006, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 627-642.

[00294] Exemplos de organismos fermentadores que podem fermentar açúcares C6 incluem organismos bacterianos e fúngicos, tais como leveduras. Leveduras preferidas inclui cepas de *Saccharomyces* spp., preferivelmente *Saccharomyces cerevisiae*.

[00295] Exemplos de organismos fermentadores que podem fermentar açúcares C5 incluem organismos bacterianos e fúngicos, tais como leveduras. Leveduras fermentadoras de C5 incluem cepas de *Pichia*, preferivelmente *Pichia stipitis*, tais como *Pichia stipitis* CBS 5773; cepas de *Candida*, preferivelmente *Candida boidinii*, *Candida brassicae*, *Candida sheatae*, *Candida diddensii*, *Candida pseudotropicalis*, ou *Candida utilis*.

[00296] Outros organismos fermentadores incluem cepas de *Zymomonas*, tal como *Zymomonas mobilis*; *Hansenula*, tal como *Hansenula anomala*; *Klyveromyces*, tal como *K. fragilis*; *Schizosaccharomyces*, tal como *S. pombe*; e *E. coli*, especialmente cepas de *E. coli* que têm sido

geneticamente modificadas para melhorar o rendimento de etanol.

[00297] Em um aspecto preferido, a levedura é uma *Saccharomyces* spp. Em um aspecto mais preferido, a levedura é *Saccharomyces cerevisiae*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Saccharomyces distaticus*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Saccharomyces uvarum*. Em outro aspecto preferido, a levedura é uma *Kluyveromyces*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Kluyveromyces marxianus*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Kluyveromyces fragilis*. Em outro aspecto preferido, a levedura é uma *Candida*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida boidinii*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida brassicae*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida diddensii*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida pseudotropicalis*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Candida utilis*. Em outro aspecto preferido, a levedura é uma *Clavispora*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Clavispora lusitaniae*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Clavispora opuntiae*. Em outro aspecto preferido, a levedura é uma *Pachysolen*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Pachysolen tannophilus*. Em outro aspecto preferido, a levedura é uma *Pichia*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é uma *Pichia stipitis*. Em outro aspecto preferido, a levedura é uma *Bretannomyces*. Em outro aspecto mais preferido, a levedura é *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, "Celulose bioconversion technology", em *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

[00298] Bactérias que podem eficientemente fermentar hexose e pentose em etanol incluem, por exemplo, *Zymomonas mobilis* e *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, *supra*).

[00299] Em um aspecto preferido,a bactéria é uma *Zymomonas*. Em um aspecto mais preferido, a bactéria é *Zymomonas mobilis*. Em outro aspecto preferido, a bactéria é uma *Clostridium*. Em outro aspecto mais

preferido, a bactéria é *Clostridium thermocellum*.

[00300] Leveduras comercialmente disponíveis adequadas para produção de etanol incluem, e.g., levedura ETHANOL RED™ yeast (disponível na Fermentis/Lesaffre, USA), FALI™ (disponível na Fleischmann's Yeast, USA), SUPERSTART™ e THERMOSACC™ fresh yeast (disponível na Ethanol Technology, WI, USA), BIOFERM™ AFT e XR (disponível na NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, USA), GERT STRAND™ (disponível na Gert Strand AB, Suécia), e FERMIOL™ (disponível na DSM Specialties).

[00301] Em um aspecto preferido, o microorganismo fermentador tem sido geneticamente modificado para proporcionar a capacidade para fermentar açúcares pentose, tais como xilose utilizando, arabinose utilizando, e Xilose e arabinose co-utilizando microorganismos.

[00302] A clonagem de genes heterólogos em vários microorganismos fermentadores tem levado à construção de organismos capazes de converter hexoses e pentoses em etanol (cofermentação) (Chen e Ho, 1993, "Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xilose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39-40: 135-147; Ho *et al.*, 1998, "Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and Xylose", *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1852-1859; Kotter e Ciriacy, 1993, "Xylose fermentation by *Saccharomyces*" *cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 776-783; Walfridsson *et al.*, 1995, "Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase", *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4184-4190; Kuyper *et al.*, 2004, "Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle", *FEMS Yeast Research* 4: 655-664; Beall *et al.*, 1991, "Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia*

coli", *Biotech. Bioeng.* 38: 296-303; Ingram *et al.*, 1998, "Metabolic engineering of bacteria for ethanol production", *Biotechnol. Bioeng.* 58: 204-214; Zhang *et al.*, 1995, "Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*", *Science* 267: 240-243; Deanda *et al.*, 1996, "Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering", *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4465-4470).

[00303] Em um aspecto preferido, o microorganismo fermentador geneticamente modificado é *Saccharomyces cerevisiae.* Em outro aspecto preferido, o microorganismo fermentador geneticamente modificado é *Zymomonas mobilis*. Em outro aspecto preferido, o microorganismo fermentador geneticamente modificado é *Escherichia coli*. Em outro aspecto preferido, o microorganismo fermentador geneticamente modificado é *Klebsiella oxytoca*.

[00304] O(s) microorganismo(s) fermentador(s) é (são) tipicamente adicionado(s) na celulose degradada ou no hidrolisado e a fermentação é realizada por cerca de 8 a cerca de 96 horas, tal como cerca de 24 a cerca de 60 horas. A temperatura está tipicamente entre cerca de 26°C e cerca de 60°C, em particular é cerca de 32°C ou 50ºC, e a cerca de pH 3 a cerca de pH 8, tal como ao redor de pH 4-5, 6, ou 7.

[00305] Em um aspecto preferido, o(s) microorganismo(s) fermentador(s) é (são) aplicados na celulose degradada ou no hidrolisado e a fermentação é realizada por cerca de 12 a cerca de 96 horas, tal como tipicamente 24-60 horas. Em um aspecto preferido, a temperatura está preferivelmente entre cerca de 20ºC e cerca de 60ºC, mais preferivelmente cerca de 25ºC e cerca de 50ºC, e muito mais preferivelmente cerca de 32ºC e cerca de 50ºC, em particular cerca de 32ºC ou 50ºC, e o pH é geralmente de cerca de pH 3 a cerca de pH 7, preferivelmente ao redor de pH 4-7. Contudo, alguns organismos fermentadores, e.g., bacterianos têm temperatura de

fermentação mais alta ótima. O(s) microorganismo(s) fermentador(es) é (são) preferivelmente aplicado(s) em quantidades de aproximadamente 10^5 a 10^{12}, preferivelmente de aproximadamente 10^7 a 10^{10}, especialmente aproximadamente 2 x 10^8 de contagem de células viáveis por ml de caldo de fermentação. Orientação adicional a respeito do uso de levedura para fermentação pode ser encontrada em, *e.g.*, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons e D.R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999), que é aqui incorporado como referência.

[00306] Para produção de etanol, após a fermentação a pasta fluida fermentada é destilada para extrair o etanol. O etanol obtido de acordo com os métodos da invenção pode ser usado como, *e.g.*, etanol combustível, etanol de bebida, *i.e.*, soluções alcoólicas neutras potáveis, ou etanol industrial.

[00307] Um estimulador de fermentação pode ser usado em combinação com qualquer um dos processos enzimáticos aqui descritos e adicionalmente melhora o processo de fermentação, e em particular, o desempenho do microorganismo fermentador, tal como, taxa de intensificação e rendimento de etanol. Um "estimulador de fermentação" refere-se aos estimuladores para crescimento dos microorganismos fermentadores, em particular, levedura. Estimuladores de fermentação preferidos para crescimento incluem vitaminas e minerais. Exemplos de vitaminas incluem multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-amino-benzóico, ácido fólico, riboflavina, e Vitaminas A, B, C, D, e E. Veja, por exemplo, Alfenore *et al.*, "Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process", Springer-Verlag (2002), que é aqui incorporado como referência. Exemplos de minerais incluem minerais e sais minerais que podem fornecer nutrientes compreendendo P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, e Cu.

[00308] Produtos de fermentação: Um produto de fermentação pode

ser qualquer substância derivada da fermentação. O produto de fermentação pode ser, sem limitação, um álcool (*e.g.*, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol, e Xilitol); um ácido orgânico (*e.g.*, ácido acético, ácido acetônico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glicônico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glicárico, ácido glicônico, ácido glicurônico, ácido glutático, ácido 3-hidróxi-propiônico, ácido itacônico, ácido lático, ácido málico, ácido malônico, ácido oxálico, ácido propiônico, ácido succínico, e ácido Xilônico); uma cetona (*e.g.*, acetona); um aldeído (*e.g.*, formaldeído); um aminoácido (*e.g.*, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, lisina, serina, e treonina); e um gás (*e.g.*, metano, hidrogênio (H_2), dióxido de carbono (CO_2), e monóxido de carbono (CO)). O produto de fermentação também pode ser um produto de valor alto.

[00309] Em um aspecto preferido, o produto de fermentação é um álcool. Será entendido que o termo "álcool" inclui uma substância que contém um ou mais grupos hidroxila. Em um aspecto mais preferido, o álcool é arabinitol. Em outro aspecto mais preferido, o álcool é butanol. Em outro aspecto mais preferido, o álcool é etanol. Em outro aspecto mais preferido, o álcool é glicerol. Em outro aspecto mais preferido, o álcool é metanol. Em outro aspecto mais preferido, o álcool é 1,3-propanodiol. Em outro aspecto mais preferido, o álcool é sorbitol. Em outro aspecto mais preferido, o álcool é xilitol. Veja, por exemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., e Tsao, G. T., 1999, "Ethanol production from renewable resources", em *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemanha, 65: 207-241; Silveira, M. M., e Jonas, R., 2002, "The biotechnological production of sorbitol", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., e Singh, D., 1995, "Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute", *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. e Blaschek, H. P., 2003, "Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii*

BA101 and *in situ* recovery by gas stripping", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.

[00310] Em outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um ácido orgânico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido acético. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido acetônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido adípico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido ascórbico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido cítrico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido 2,5-diceto-D-glicônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido fórmico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido fumárico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido glicárico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido glicônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido glicurônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido glutárico. Em outro aspecto preferido, o ácido orgânico é ácido 3-hidróxi-propiônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido itacônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido lático. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido málico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido malônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido oxálico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido propiônico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido succínico. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido xilônico. Veja, por exemplo, Chen, R., e Lee, Y. Y., 1997, "Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448.

[00311] Em outro aspecto preferido, o produto de fermentação é uma cetona. Será entendido que o termo "cetona" inclui um substrato que contém um ou mais grupo cetona. Em outro aspecto mais preferido, a cetona é

acetona. Veja, por exemplo, Qureshi e Blaschek, 2003, *supra*.

[00312] Em outro aspecto preferido, o produto de fermentação um aldeído. Em outro aspecto mais preferido, o aldeído é formaldeído.

[00313] Em outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um aminoácido. Em outro aspecto mais preferido, o ácido orgânico é ácido aspártico. Em outro aspecto mais preferido, o aminoácido é ácido glutâmico. Em outro aspecto mais preferido, o aminoácido é glicina. Em outro aspecto mais preferido, o aminoácido é lisina. Em outro aspecto mais preferido, o aminoácido é serina. Em outro aspecto mais preferido, o aminoácido é treonina. Veja, por exemplo, Richard, A., e Margaritis, A., 2004, "Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolimers", *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 501-515.

[00314] Em outro aspecto preferido, o produto de fermentação é um gás. Em outro aspecto mais preferido, o gás é metano. Em outro aspecto mais preferido, o gás é H_2. Em outro aspecto mais preferido, o gás é CO_2. Em outro aspecto mais preferido, o gás é CO. Veja, por exemplo, Kataoka, N., A. Miya, e K. Kiriyama, 1997, "Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria", *Water Science and Technology* 36 (6-7): 41-47; e Gunaseelan V.N. in *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, "Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review".

[00315] Recuperação. O(s) produto(s) de fermentação pode(m) ser opcionalmente recuperado(s) do meio de fermentação usando qualquer método conhecido na arte incluindo, mas não limitado a, cromatografia (*e.g.*, troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização, e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (*e.g.*, focalização isoelétrica preparativa), solubilidade diferencial (*e.g.*, precipitação de sulfato de amônio), destilação, ou extração. Por exemplo, etanol é separado do material

fermentado contendo celulose e purificado por métodos convencionais de destilação. Etanol com uma pureza de até cerca de 96% vol. pode ser obtido, que pode ser usado como, por exemplo, etanol combustível, etanol para bebidas, *i.e.*, soluções alcoólicas neutras potáveis, ou etanol industrial.

[00316] A presente invenção é posteriormente descrita por meio dos seguintes exemplos que não devem ser entendidos como limitantes do escopo da invenção.

Exemplos

Materiais

[00317] Compostos químicos usados como tampões e substratos foram produtos comerciais de grau pelo menos reagente.

Sequenciamento de DNA

[00318] Sequenciamento de DNA foi realizado usando um Analisador Genético Applied Biosystems Model 3130X (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando química de terminador de corante (Giesecke *et al.*, 1992, *Journal of Virol. Methods* 38: 47-60). Sequências foram montadas usando phred/phrap/consed (University of Washington, Seattle, WA, USA) com iniciadores específicos de sequência.

Meios

[00319] Meio NNCYP foi composto por litro de 5,0 g de NH_4NO_3, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 g de $CaCl_2$, 2,5 g de ácido cítrico, 1,0 g de Peptona Bacto, 5,0 g de extrato de levedo, solução de metais traço COVE, e suficiente K_2HPO_4 para alcançar um pH final de aproximadamente 5,4.

[00320] Solução de metais traço COVE foi composta por litro de 0,04 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0,4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,8 g de $Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$, e 10 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

[00321] Meio YP foi composto por litro de 10 g de extrato de levedo e 20 g de triptona bacto.

[00322] Meio indutor de celulase foi composto por litro de 20 g de

celulose, 10 g de sólidos de macerado de milho, 1,45 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2,08 g de KH_2PO_4, 0,28 g de $CaCl_2$, 0,42 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, e 0,42 ml de solução de metais traço.

[00323] Solução de metais traço foi composta por litro de 216 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 58 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,4 g de H_3BO_3, e 336 g de ácido cítrico.

[00324] STC foi composto de sorbitol 1 M, $CaCl_2$ 10 mM, e Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

[00325] Placas COVE foram compostas por litro de 342 g de sacarose, 10 ml de soluções de sais COVE, 10 ml de acetamida 1 M, 10 ml de CsCl 1,5 M, e 25 g de ágar Noble.

[00326] Solução de sais COVE foi composta por litro de 26 g de KCl, 26 g de $MgSO_4$, 76 g de KH_2PO_4, e 50 ml de solução de metais traço COVE.

[00327] Placas COVE2 foram compostas por litro de 30 g de sacarose, 20 ml de solução de sais COVE, 25 g de ágar Noble, e 10 ml de acetamida 1 M.

[00328] Placas PDA foram compostas por litro de 39 gramas de ágar de dextrose de batata.

[00329] Meio LB foi composto por litro de 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedo, 5 g de cloreto de sódio.

[00330] Placas 2X YT-Amp foram compostas por litro de 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedo, 5 g de cloreto de sódio, e 15 g de Ágar Bacto, seguido por 2 ml de uma solução esterilizada por filtração de ampicilina 50 mg/ml após autoclavagem.

[00331] Meio MDU2BP foi composto por litro de 45 g de maltose, 1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de NaCl, 2 g de K_2HSO_4, 12 g de KH_2PO_4, 2 g de uréia, e 500 µl de solução de metais traço AMG, o pH foi ajustado para 5,0 e então esterilizado por filtração com uma unidade de filtração de 0,22 µm.

[00332] Solução de metais traço AMG foi composta por litro de 14,3 g

de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 g de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 13,8 g de $FeSO_4 \cdot H_2O$, 8,5 g de $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, e 3 g de ácido cítrico.

[00333] Placas de meio mínimo foram compostas por litro de 6 g de $NaNO_3$, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH_2PO_4, 1 ml de solução de metais traço COVE, 20 g de ágar Noble, 20 ml de glicose 50%, 2,5 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20%, e 20 ml de solução de estoque de biotina.

[00334] Solução de estoque de biotina foi composta por litro de 0,2 g de biotina.

[00335] Meio SOC foi composto de 2% de triptona, 0,5% de extrato de levedo, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, e $MgSO_4$ 10 mM, seguido por glicose esterilizada por filtração para 20 mM após autoclavagem.

Exemplo 1: Construção de vetor de expressão pMJ04

[00336] Vetor de expressão pMJ04 foi construído por amplificação por PCR do gene de exocelobioidrolase 1 de *Trichoderma reesei* (*cbh1*, CEL7A) terminador de DNA genômico de *Trichoderma reesei* RutC30 usando iniciadores 993429 (anti-senso) e 993428 (senso) mostrados abaixo. O iniciador de anti-senso foi engenhado para ter um sítio *Pac* I na extremidade-5' e um sítio *Spe* I na extremidade-3' do iniciador de senso.

Iniciador 993429 (anti-senso):

5’-AACGTTAATTAAGGAATCGTTTTGTGTTT-3’ (SEQ ID NO: 29)

Iniciador 993428 (senso):

5’-AGTACTAGTAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG-3’ (SEQ ID NO: 30)

[00337] DNA genômico de *Trichoderma reesei* RutC30 foi isolado usando um Kit DNEASY® Plant Maxi (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

[00338] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X Tampão de Reação ThermoPol (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), dNTPs 0,3 mM, 100 ng de DNA genômico de *Trichoderma reesei* RutC30, iniciador 993429 0,3 µM , iniciador 993428 0,3 µM, e 2 unidades de Vent DNA polimerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). As reações

foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA) programado para 5 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, e 60 segundos a 72°C, seguido por 25 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, e 120 segundos a 72°C (extensão final de 5 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 0,1% usando tampão base Tris 40 mM - acetato de sódio 20 mM - EDTA dissódico 1 mM (TAE) onde uma banda de produto de 229 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

[00339] O fragmento de PCR resultante foi digerido com *Pac* I e *Spe* I e ligado em pAlLo1 (WO 05/067531) digerido com as mesmas enzimas de restrição usando um Kit de Ligação Rápida (Roche, Indianapolis, IN, USA), para gerar pMJ04 (Figura 1).

Exemplo 2: Construção de pCaHj568

[00340] Plasmídeo pCaHj568 foi construído a partir de pCaHj170 (Patente U.S. No. 5.763.254) e pMT2188. Plasmídeo pCaHj170 compreende a região codificadora de comprimento total de endoglicanase V de *Humicola insolens* (CEL45A) (SEQ ID NO: 31, que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 32). Construção de pMT2188 foi iniciada por amplificação por PCR da origem de replicação de pUC19 a partir de pCaHj483 (WO 98/00529) usando iniciadores 142779 e 142780 mostrados abaixo. Iniciador 142780 introduz um sítio *Bbu* I no fragmento de PCR.

Iniciador 142779:

5’-TTGAATTGAAAATAGATTGATTTAAAACTTC-3’ (SEQ ID NO: 33)

Iniciador 142780:

5’-TTGCATGCGTAATCATGGTCATAGC-3’ (SEQ ID NO: 34)

[00341] Um Sistema de PCR EXPAND® (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Suíça) foi usado seguindo as instruções do fabricante

para esta amplificação. Produtos da PCR foram separados sobre um gel de agarose e um fragmento de 1160 pb foi isolado e purificado usando um Kit Spin de Extração de Gel Jetquick (Genomed, Wielandstr, Alemanha).

[00342] O gene URA3 foi amplificado a partir do vetor de clonagem geral pYES2 de Saccharomyces *cerevisiae* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) usando iniciadores 140288 e 142778 mostrados abaixo usando um Sistema de PCR EXPAND®. Iniciador 140288 introduziu um sítio *Eco* RI no fragmento de PCR.

Iniciador 140288:

5'-TTGAATTCATGGGTAATAACTGATAT-3' (SEQ ID NO: 35)

Iniciador 142778:

5'-AAATCAATCTATTTTCAATTCAATTCATCATT-3' (SEQ ID NO: 36)

[00343] Produtos da PCR foram separados sobre um gel de agarose e um fragmento de 1126 pb foi isolado e purificado usando um Kit Spin de Extração de Gel Jetquick.

[00344] Os dois fragmentos de PCR foram fusionados por misturação e amplificados usando iniciadores 142780 e 140288 mostrados acima pelo método de emenda por trespasse (Horton *et al.*, 1989, *Gene* 77: 61-68). Produtos da PCR foram separados sobre um gel de agarose e um fragmento de 2263 pb foi isolado e purificado usando um Kit Spin de Extração de Gel Jetquick.

[00345] O fragmento resultante foi digerido com *Eco* RI e *Bbu* I e ligado usando protocolos padrão no fragmento mais longo de pCaHj483 digerido com a mesmas enzimas de restrição. A mistura de ligação foi transformada em *pyrF*-negative *E. coli* cepa DB6507 (ATCC 35673) tornada competente pelo método de Mandel e Higa, 1970, *J. Mol. Biol.* 45: 154. Transformantes foram selecionados sobre meio M9 sólido (Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press) suplementado por litro com 1 g de casaminoácidos,

500 μg de tiamina, e 10 mg de canamicina. A plasmídeo de um transformante foi isolado e designado pCaHj527 (Figura 2).

[00346] O promotor NA2-tpi presente em pCaHj527 foi submetido à mutagênese sítio-direcionada por PCR usando um Sistema de PCR EXPAND® de acordo com as instruções do fabricante. Nucleotídeos 134–144 foram convertidos de GTACTAAAACC (SEQ ID NO: 37) em CCGTTAAATTT (SEQ ID NO: 38) usando iniciador mutagênico 141223 mostrado abaixo.

Iniciador 141223:

5’-GGATGCTGTTGACTCCGGAAATTTAACGGTTTGGTCTTGCATCC C-3’ (SEQ ID NO: 39)

Nucleotídeos 423–436 foram convertidos de ATGCAATTTAAACT (SEQ ID NO: 40) em CGGCAATTTAACGG (SEQ ID NO: 41) usando iniciador mutagênico 141222 mostrado abaixo.

Iniciador 141222:

5’-GGTATTGTCCTGCAGACGGCAATTTAACGGCTTCTGCGAATCG C-3’ (SEQ ID NO: 42)

O plasmídeo resultante foi designado pMT2188 (Figura 3).

[00347] A região codificadora de endoglicanase V de *Humicola insolens* foi transferida de pCaHj170 como um fragmento *Bam* HI-*Sal* I para pMT2188 digerido com *Bam* HI e X*ho* I para gerar pCaHj568 (Figura 4). Plasmídeo pCaHj568 compreende um promotor NA2-tpi mutado operacionalmente ligado na sequência codificadora de comprimento total de endoglicanase V de *Humicola insolens*.

Exemplo 3: Construção de pMJ05

[00348] Plasmídeo pMJ05 foi construído por amplificação por PCR da região codificadora de comprimento total de endoglicanase V de *Humicola insolens* de 915 pb a partir de pCaHj568 usando iniciadores HiEGV-F e HiEGV-R mostrados abaixo.

Iniciador HiEGV-F (senso):

5’-AAGCTTAAGCATGCGTTCCTCCCCCCTCC-3’ (SEQ ID NO: 43)

Iniciador HiEGV-R (anti-senso):

5’-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3’ (SEQ ID NO: 44)

[00349] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X Tampão de Reação ThermoPol (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), dNTPs 0,3 mM, 10 ng/µl de pCaHj568, iniciador HiEGV-F 0,3 µM, iniciador HiEGV-R 0,3 µM, e 2 unidades de Vent DNA polimerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 5 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, e 60 segundos a 72°C, seguido por 25 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, e 120 segundos a 72°C (extensão final de 5 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de 937 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00350] O fragmento purificado de 937 pb foi usado como DNA modelo para amplificações subsequentes com os seguintes iniciadores:

Iniciador HiEGV-R (anti-senso):

5’-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3’ (SEQ ID NO: 45)

Iniciador HiEGV-F-overlap (senso):

5’-*ACCGCGGACTGCGCATC*ATGCGTTCCTCCCCCCTCC-3’ (SEQ ID NO: 46)

[00351] Sequências de iniciador em itálico são homólogas a 17 pb do promotor de gene de celobioidrolase I (*cbh1*) de *Trichoderma reesei* (WO 91/17243) e sequências de iniciador sublinhadas são homólogas a 29 pb da região codificadora de endoglicanase V de *Humicola insolens*. Um

recobrimento de 36 pb entre o promotor e a sequência codificadora permitiu fusão precisa de um fragmento de 994 pb compreendendo o promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* no fragmento de 918 pb compreendendo a região codificadora de endoglicanase V de *Humicola insolens*.

[00352] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X Tampão de Reação ThermoPol, dNTPs 0,3 mM, 1 µl de fragmento de PCR de 937 pb purificado, iniciador HiEGV-F-overlap 0,3 µM, iniciador HiEGV-R 0,3 µM, e 2 unidades de Vent DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 5 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, e 60 segundos a 72°C, seguido por 25 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, e 120 segundos a 72°C (extensão final de 5 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 945 kb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00353] Uma PCR separada foi realizada para amplificar a sequência de promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* se estendendo de 994 pb a montante do códon de iniciação ATG do gene de DNA genômico de *Trichoderma reesei* RutC30 usando os iniciadores mostrados abaixo (o iniciador de senso foi engenhado para ter um sítio de restrição *Sal* I na extremidade-5'). DNA genômico de *Trichoderma reesei* RutC30 foi isolado usando um Kit DNEASY® Plant Maxi.

Iniciador TrCBHIpro-F (senso):

5’-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3’ (SEQ ID NO: 47)

Iniciador TrCBHIpro-R (anti-senso):

5’-GATGCGCAGTCCGCGGT-3’ (SEQ ID NO: 48)

[00354] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X Tampão de Reação ThermoPol, dNTPs 0,3 mM, 100 ng/µl DNA genômico de

Trichoderma reesei RutC30, iniciador TrCBHIpro-F 0,3 μM, iniciador TrCBHIpro-R 0,3 μM, e 2 unidades de Vent DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, e 120 segundos a 72°C (extensão final de 5 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 998 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00355] O fragmento de PCR de 998 pb purificado foi usado como DNA modelo para amplificações subsequentes usando os iniciadores mostrados abaixo.

Iniciador TrCBHIpro-F:

5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEQ ID NO: 49)

Iniciador TrCBHIpro-R-overlap:

5'-GGAGGGGGGAGGAACGCAT*GATGCGCAGTCCGCGGT*-3' (SEQ ID NO: 50)

[00356] Sequências em itálico são homólogas a 17 pb do promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* e sequências sublinhadas são homólogas a 29 pb da região codificadora de endoglicanase V de *Humicola insolens*. Um recobrimento de 36 pb entre o promotor e a sequência codificadora permitiu a fusão precisa do fragmento de 994 pb compreendendo o promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* no fragmento de 918 pb compreendendo a região codificadora de comprimento total de endoglicanase V de *Humicola insolens*.

[00357] As reações de amplificação (50 μl) foram compostas de 1X Tampão de Reação ThermoPol, dNTPs 0,3 mM, 1 μl do fragmento de PCR de 998 pb purificado, iniciador TrCBH1pro-F 0,3 μM, iniciador TrCBH1pro-R-overlap 0,3 μM, e 2 unidades de Vent DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado

para 5 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, e 60 segundos a 72°C, seguido por 25 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, e 120 segundos a 72°C (extensão final de 5 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 1017 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00358] O promotor *cbh1* de 1017 pb de fragmento de PCR de *Trichoderma reesei* e o fragmento de PCR de endoglicanase V de 945 pb de *Humicola insolens* foram usados como DNA modelo para amplificação subsequente usando os seguintes iniciadores para precisamente fusionar o promotor *cbh1* de 994 pb na região codificadora de comprimento total de endoglicanase V de 918 pb PCR de recobrimento.

Iniciador TrCBHIpro-F:

5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEQ ID NO: 51)

Iniciador HiEGV-R:

5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEQ ID NO: 52)

[00359] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X Tampão de Reação ThermoPol, dNTPs 0,3 mM, iniciador TrCBH1pro-F 0,3 µM, iniciador HiEGV-R 0,3 µM, e 2 unidades de Vent DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 5 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, e 60 segundos a 72°C, seguido por 25 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, e 120 segundos a 72°C (extensão final de 5 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 1926 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00360] O fragmento resultante de 1926 pb foi clonado em um vetor pCR®-Blunt-II-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) usando um ZEROBLUNT® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. O plasmídeo resultante foi digerido com *Not* I e *Sal* I e o fragmento de 1926 pb foi purificado por gel usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® e ligado usando T4 DNA ligase (Roche, Indianapolis, IN, USA) em pMJ04, que também foi digerido com as mesmas duas enzimas de restrição, para gerar pMJ05 (Figura 5). Plasmídeo pMJ05 compreende o promotor de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* e terminador operacionalmente ligado na sequência codificadora de comprimento total de endoglicanase V de *Humicola insolens*.

Exemplo 4: Construção de vetor de expressão pSMai130

[00361] Um fragmento de DNA de 2586 pb incluindo desde o códon de iniciação ATG até o códon de terminação TAA de uma sequência codificadora de comprimento total de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 15 para sequência de cDNA e SEQ ID NO: 16 para a sequência de aminoácidos deduzida; *E. coli* DSM 14240) foi amplificado por PCR a partir de pJaL660 (WO 2002/095014) como modelo com iniciadores 993467 (senso) e 993456 (anti-senso) mostrados abaixo. Um sítio *Spe* I foi engenhado na extremidade 5' do iniciador de anti-senso para facilitar ligação. Sequências de iniciador em itálico são homólogas a 24 pb do promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* e sequências sublinhadas são homólogas a 22 pb da região codificadora de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae*.

Iniciador 993467:

5’-*ATAGTCAACCGCGGACTGCGCATC*ATGAAGCTTGGTTGGATCGAGG-3’ (SEQ ID NO: 53)

Iniciador 993456:

5’-ACTAGTTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3’ (SEQ ID NO: 54)

[00362] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de

Tampão de Amplificação *Pfx* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), dNTPs 0,25 mM, 10 ng de pJaL660, iniciador 993467 6,4 µM, iniciador 993456 3,2 µM, $MgCl_2$ 1 mM, e 2,5 unidades de *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, e 3 minutos a 72°C (extensão final de 15 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 2586 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00363] Uma PCR separada foi realizada para amplificar a sequência de promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* se estendendo de 1000 pb a montante do códon de iniciação ATG do gene, usando iniciador 993453 (senso) e iniciador 993463 (anti-senso) mostrados abaixo para gerar um fragmento de PCR de 1000 pb.

Iniciador 993453:

5’-GTCGACTCGAAGCCCGAATGTAGGAT-3’ (SEQ ID NO: 55)

Iniciador 993463:

5’-CCTCGATCCAACCAAGCTTCAT*GATGCGCAGTCCGCGGTTGACTA*-3’ (SEQ ID NO: 56)

[00364] Sequências de iniciador em itálico são homólogas a 24 pb do promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* e sequências de iniciador sublinhadas são homólogas a 22 pb da região codificadora de comprimento total de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*. O recobrimento de 46 pb entre o promotor e a sequência codificadora permitiu a fusão precisa do fragmento de 1000 pb compreendendo o promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* no fragmento de 2586 pb compreendendo a região codificadora de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae*.

[00365] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de

Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 0,25 mM, 100 ng de DNA genômico de *Trichoderma reesei* RutC30, iniciador 993453 6,4 µM, iniciador 993463 3,2 µM, $MgCl_2$ 1 mM, e 2,5 unidades de *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, e 3 minutos a 72°C (extensão final de 15 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 1000 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00366] Os fragmentos purificados foram usados como DNA modelo para amplificação subsequente por PCR de recobrimento usando iniciador 993453 (senso) e iniciador 993456 (anti-senso) mostrados acima para precisamente fusionar o fragmento de 1000 pb compreendendo o promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* no fragmento de 2586 pb compreendendo a região codificadora de comprimento total de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*.

[00367] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 0,25 mM, iniciador 99353 6,4 µM, iniciador 993456 3,2 µM, $MgCl_2$ 1 mM, e 2,5 unidades de *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, e 4 minutos a 72°C (extensão final de 15 minutos).

[00368] O fragmento resultante de 3586 pb foi digerido com *Sal* I e *Spe* I e ligado em pMJ04, digerido com as mesmas duas enzimas de restrição, para gerar pSMai130 (Figura 6). Plasmídeo pSMai130 compreende o terminador e o promotor de gene de celobioidrolase nativa de *Trichoderma reesei* operacionalmente ligados nas sequência de sinal de beta-glicosidase nativa de *Aspergillus oryzae* e sequência codificadora (*i.e.*, sequência codificadora de beta-glicosidase de comprimento total de *Aspergillus oryzae*).

Exemplo 5: Construção de pSMai135

[00369] A região codificadora madura de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (menos a sequência de sinal nativa, veja Figura 7; SEQ ID NOs: 57 e 58 para O peptídeo de sinal e sua sequência codificadora) de Lys-20 até códon de terminação TAA foi amplificada por PCR a partir de pJaL660 como modelo com iniciador 993728 (senso) e iniciador 993727 (anti-senso) mostrados abaixo.

Iniciador 993728:

5'-*TGCCGGTGTTGGCCCTTGCC*AAGGATGATCTCGCGTACTCCC-3' (SEQ ID NO: 59)

Iniciador 993727:

5'-GACTAGTCTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3' (SEQ ID NO: 60)

[00370] Sequências em itálico são homólogas a 20 pb da sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* e sequências sublinhadas são homólogas a 22 pb da região codificadora de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae*. Um site *Spe* I foi engenhado na extremidade 5' do iniciador de anti-senso.

[00371] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 0,25 mM, 10 ng/µl de pJaL660, iniciador 993728 6,4 µM iniciador 993727, 3,2 µM, $MgCl_2$ 1 mM, e 2,5 unidades de *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, e 3 minutos a 72°C (extensão final de 15 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 2523 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00372] Uma amplificação por PCR separada foi realizada para amplificar 1000 pb do promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* e 63 pb da

sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* (códon de iniciação ATG até Ala-21, Figura 8, SEQ ID NOs: 61 e 62), usando iniciador 993724 (senso) e iniciador 993729 (anti-senso) mostrados abaixo.

Iniciador 993724:

5'-ACGCGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATCC-3' (SEQ ID NO: 61)

Iniciador 993729:

5'-GGGAGTACGCGAGATCATCCTT*GGCAAGGGCCAACACCGGCA*-3' (SEQ ID NO: 62)

[00373] Sequências de iniciador em itálico são homólogas a 20 pb da sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* e sequências de iniciador sublinhadas são homólogas a 22 pb da região codificadora de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae*.

[00374] Plasmídeo pMJ05, que compreende a região codificadora de endoglicanase V de *Humicola insolens* sob o controle do promotor *cbh1*, foi usado como modelo para gerar um fragmento de 1063 pb compreendendo o promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* e fragmento de sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*. Um recobrimento de 42 pb foi compartilhado entre o promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* e a sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* e a sequência codificadora madura de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* para proporcionar uma ligação perfeita entre o promotor e o códon de iniciação ATG da região codificadora de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae* de 2523 pb.

[00375] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 0,25 mM, 10 ng/µl de pMJ05, iniciador 993728 6,4 µM, iniciador 993727 3,2 µM, $MgCl_2$ 1 mM, e 2,5 unidades de *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, e 4 minutos a 72°C (extensão final de 15 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose

1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 1063 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00376] Os fragmentos de recobrimento purificados foram usados como modelos para amplificação usando iniciador 993724 (senso) e iniciador 993727 (anti-senso) descritos acima para precisamente fusionar o fragmento de 1063 pb compreendendo o promotor *cbh1 de Trichoderma reesei* e a sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* no fragmento 2523 pb compreendendo a matriz de região codificadora madura de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* por PCR de recobrimento.

[00377] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 0,25 mM, iniciador 993724 6,4 µM, iniciador 993727 3,2 µM, $MgCl_2$ 1 mM, e 2,5 unidades de *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, e 4 minutos a 72°C (extensão final de 15 minutos). Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 3591 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00378] O fragmento resultante de 3591 pb foi digerido com *Sal* I e *Spe* I e ligado em pMJ04 digerido com a mesmas enzimas de restrição para gerar pSMai135 (Figura 9). Plasmídeo pSMai135 compreende os terminador e promotor de gene de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* operacionalmente ligados na sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* e na sequência codificadora madura de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae*.

Exemplo 6: Expressão de beta-glicosidase de *Aspergillus* oryzae com o sinal de secreção de endoglicanase V de *Humicola insolens*

[00379] Plasmídeo pSMai135 codificador da beta-glicosidase madura de *Aspergillus oryzae* ligado no sinal de secreção de endoglicanase V de *Humicola insolens* (Figura 8) foi introduzido em *Trichoderma reesei* RutC30 por transformação mediada por PEG (Penttila *et al.*, 1987, *Gene* 61 155-164). O plasmídeo continha o gene *amdS* de *Aspergillus nidulans* para permitir que transformantes crescessem sobre acetamida como a única fonte de nitrogênio.

[00380] *Trichoderma reesei* RutC30 foi cultivada a 27°C e 90 rpm em 25 ml de meio YP suplementado com 2% (p/v) de glicose e uridina 10 mM por 17 horas. Micélios foram colhidos por filtração usando um Sistema de Filtração Descartável Acionado por Vácuo (Millipore, Bedford, MA, USA) e lavados duas vezes com água deionizada e duas vezes com sorbitol 1,2 M. Protoplastos foram gerados por suspensão dos micélios lavados em 20 ml de sorbitol 1,2 M contendo 15 mg de GLUCANEX® (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) por ml e 0,36 unidade de quitinase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por ml e incubando por 15-25 minutos a 34°C com agitação cuidadosa a 90 rpm. Protoplastos foram colhidos por centrifugação por 7 minutos a 400 *x g* e lavados duas vezes com sorbitol 1,2 M frio. Os protoplastos foram contados usando um hemacitômetro e ressuspensos em STC para uma concentração final de 1 X 10^8 protoplastos por ml. Protoplastos em excesso foram armazenados em um Recipiente de Congelamento Cryo 1°C (Nalgene, Rochester, NY, USA) a -80°C.

[00381] Aproximadamente 7 µg de pSMai135 digerido com *Pme* I foram adicionados em 100 µl de solução de protoplasto e misturados cuidadosamente, seguidos por 260 µl de tampão PEG, misturados, e incubados na temperatura ambiente por 30 minutos. STC (3 ml) foi então adicionado e misturado e a solução de transformação foi plaqueada sobre placas COVE usando seleção de *amdS* de *Aspergillus nidulans*. As placas foram incubadas a 28°C por 5-7 dias. Transformantes foram sub-cultivados sobre placas COVE2 e crescidos a 28°C.

[00382] Sessenta e sete transformantes designados SMA135 obtidos com pSMai135 foram subcultivados sobre placas novas contendo acetamida e permitidos esporularem por 7 dias a 28°C.

[00383] Os 67 transformantes *Trichoderma reesei* SMA135 foram cultivados em 125 ml frascos agitadores com defletores contendo 25 ml de meio indutor de celulase em pH 6,0 inoculados com esporos dos transformantes e incubados a 28°C e 200 rpm por 7 dias. *Trichoderma reesei* RutC30 foi usado como um controle. Amostras de caldo de cultura foram removidas no dia 7. Um ml de cada caldo de cultura foi centrifugado a 15.700 *x g* por 5 minutos em uma micro-centrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos. Amostras foram armazenadas a 4°C até ensaio de enzima. Os sobrenadantes foram ensaiados para atividade de beta-glicosidase usando p-nitro-fenil-beta-D-glicopiranosídeo como substrato, como descrito abaixo.

[00384] Atividade de beta-glicosidase foi determinada na temperatura ambiente usando alíquotas de 25 µl de sobrenadante de cultura, diluídas 1:10 em succinato 50 mM pH 5,0, em 200 µl de 0,5 mg/ml usando p-nitro-fenil-beta-D-glicopiranosídeo como substrato em succinato 50 mM pH 5,0. Após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de Tris-HCl 1 M pH 8,0 e a absorbância foi lida espectrofotometricamente a 405 nm. Uma unidade de atividade de beta-glicosidase corresponde à produção de 1 µmol de *p*-nitro-fenil por minuto por litro em pH 5,0, temperatura ambiente. Beta-glicosidase de *Aspergillus niger* (NOVOZYM™ 188, Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) foi usada como uma enzima padrão.

[00385] Numerosos transformantes SMA135 produziram atividades de beta-glicosidase várias vezes mais altas do que a de *Trichoderma reesei* RutC30. Transformante SMA135-04 produziu a atividade mais alta de beta-glicosidase.

[00386] SDS-PAGE foi realizada usando geles CRITERION® Tris-

HCl (resolução de 5%) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) com o Sistema CRITERION® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cinco µl de sobrenadantes de dia 7 (veja acima) foram suspensos em 2X concentração de Tampão de Amostra Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e fervidos na presença de beta-mercapto-etanol 5% por 3 minutos. As amostras de sobrenadante foram carregadas sobre um gel de poliacrilamida e submetidas à eletroforese com 1X Tris/Glicina/SDS como tampão de corrida (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). O gel resultante foi colorido com Corante Coomassie BIO-SAFE® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

[00387] Totalmente, 26 dos 38 transformantes *Trichoderma reesei* SMA135 produziram uma proteína de aproximadamente 110 kDa que não foi visível em *Trichoderma reesei* RutC30 como controle. Transformante *Trichoderma reesei* SMA135-04 produziu o nível mais alto de beta-glicosidase.

Exemplo 7: Construção de vetor de expressão pSMai140

[00388] Vetor de expressão pSMai140 foi construído por digestão de plasmídeo pSATe111BG41 (WO 04/099228), que traz a região codificadora de comprimento total de BG41 variante de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 25 que codifica a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26), com *Nco* I. O fragmento resultante de 1243 pb foi isolado por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE e purificado usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00389] Vetor de expressão pSMai135 foi digerido com *Nco* I e um fragmento de 8286 pb foi isolado por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE e purificado usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante. o fragmento de 1243 pb de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* digerido por *Nco* I foi então ligado no fragmento de vetor de 8286 pb, usando T4 DNA

ligase (Roche, Indianapolis, IN, USA) de acordo com o protocolo do fabricante, para criar o vetor de expressão pSMai140 (Figura 10). Plasmídeo pSMai140 compreende o terminador e o promotor de gene de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* (CEL7A) operacionalmente ligados na sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* e na sequência codificadora madura de variante de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae*.

Exemplo 8: Transformação de *Trichoderma reesei* RutC30 com pSMai140

[00390] Plasmídeo pSMai140 foi linearizado com *Pme* I e transformado na *Trichoderma reesei* cepa *RutC30* como descrito em Exemplo 6. Um total de 100 transformantes foi obtido de 4 experimentos de transformação independentes, todos os quais foram cultivados em frascos agitados em meio indutor de celulase, e a atividade de beta-glicosidase foi medida do meio de cultura dos transformantes como descrito em Exemplo 6. Numerosos transformantes *Trichoderma reesei* SMA140 mostraram atividades de beta-glicosidase várias vezes maior do que aquela de *Trichoderma reesei* RutC30.

[00391] A presença da proteína BG41 variante de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae* no meio de cultura foi detectada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida como descrito em Exemplo 6 e coloração com Coomassie dos mesmos 13 sobrenadantes de cultura cujas atividades de enzima foram analisadas. Todos os treze transformantes que tiveram atividade de β-glicosidase alta, também expressaram a variante GB41 de beta-glicosidade de *Aspergillus oryzae* de aproximadamente 110 KDa, em rendimentos variados.

[00392] O transformante expressando variante de beta-glicosidade mais alto, conforme avaliado pelo ensaio de atividade de beta-glicosidase e eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, foi designado *Trichoderma reesei* SMA140-43

Exemplo 9: Construção de vetor de expressão pSaMe-F1

[00393] Um fragmento de DNA contendo 209 pb do promotor de gene de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* e a região core (nucleotídeos 1 a 702 de SEQ ID NO: 31, que codifica aminoácidos 1 a 234 de SEQ ID NO: 32; WO 91/17243) do gene de endoglicanase V de *Humicola insolens* foi amplificado por PCR usando pMJ05 como modelo e os iniciadores mostrados abaixo.

Iniciador 995103:

5'-cccaagcttagccaagaaca-3' (SEQ ID NO: 65)

Iniciador 995137:

5'-gggggaggaacgcatgggatctggacggc-3' (SEQ ID NO: 66)

[00394] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 10 mM, $MgSO_4$ 50 mM, 10 ng/µl de pMJ05, 50 picomoles de iniciador 995103, 50 picomoles de iniciador 995137, e 2 unidades de *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, e 60 segundos a 72°C (extensão final de 3 minutos).

[00395] Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 911 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00396] Um fragmento de DNA contendo 806 pb do gene de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* foi amplificado por PCR usando pSMai140 como modelo e os iniciadores mostrados abaixo.

Iniciador 995133:

5'-gccgtccagatccccatgcgttcctccccc-3' (SEQ ID NO: 67)

Iniciador 995111:

5'-ccaagcttgttcagagtttc-3' (SEQ ID NO: 68)

[00397] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X

Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 10 mM, $MgSO_4$ 50 mM, 100 ng de pSMai140, 50 picomoles de iniciador 995133, 50 picomoles de iniciador 995111, e 2 unidades de *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para 30 ciclos cada um por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, e 120 segundos a 72°C (extensão final de 3 minutos).

[00398] Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 806 pb foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00399] Os dois fragmentos de PCR acima foram então submetidos à PCR de recobrimento. Os fragmentos de recobrimento purificados foram usados como modelos para amplificação usando iniciador 995103 (senso) e iniciador 995111 (anti-senso) descritos acima para precisamente fusionar o fragmento de 702 pb compreendendo 209 pb do promotor de gene de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* e a sequência core de endoglicanase V de *Humicola insolens* no fragmento de 806 pb compreendendo uma porção da região codificadora de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* por PCR de recobrimento.

[00400] As reações de amplificação (50 µl) foram compostas de 1X Tampão de Amplificação *Pfx*, dNTPs 10 mM, $MgSO_4$ 50 mM, 2,5 µl de cada fragmento (20 ng/µl), 50 picomoles de iniciador 995103, 50 picomoles de iniciador 995111, e 2 unidades de alta fidelidade *Pfx* DNA polimerase. As reações foram incubadas em um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 programado para desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C seguida por 30 ciclos cada um por 1 minuto de desnaturação, 1 minuto de anelamento a 60°C, e a 3 minutos de extensão a 72°C.

[00401] Os produtos de reação foram isolados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE onde uma banda de produto de 1,7 kb

foi excisada do gel e purificada usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante.

[00402] O fragmento de 1,7 kb foi ligado em um Vetor pCR®4 Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O construto foi então transformado em células de *E. coli* Quimicamente Competentes ONE SHOT® TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com o procedimento de transformação química rápida do fabricante. Colônias foram selecionadas e analisadas por isolamento de plasmídeo e digestão com *Hind* III para liberar o fragmento de PCR de recobrimento de 1,7 kb.

[00403] Plasmídeo pSMai140 também foi digerido com *Hind* III para linearizar o plasmídeo. Ambos os fragmentos digeridos foram combinados em uma reação de ligação usando um Kit de Ligação Rápida de DNA seguindo as instruções do fabricante para produzir pSaMe-F1 (Figura 11).

[00404] Células Competentes de *E. coli* de Grau de Subclonagem XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) foram transformadas com o produto de ligação. Identidade do construto foi confirmada por sequenciamento de DNA de o promotor de gene de celobioidrolase de *Trichoderma reesei*, a sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*, a sequência core de endoglicanase V de *Humicola insolens*, a sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*, variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*, e a sequência de terminador de gene de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei* dos plasmídeos purificados de *E. coli* transformada. Um clone contendo o plasmídeo recombinante foi designado pSaMe-F1. Plasmídeo pSaMe-F1 compreende o promotor e o terminador de gene de celobioidrolase de *Trichoderma reesei* e a sequência de peptídeo de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens* ligada diretamente no polipeptídeo core de endoglicanase V de *Humicola insolens* que são fusionados diretamente no peptídeo de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*

que é ligado diretamente na sequência codificadora madura de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*. A sequência de DNA e a sequência de aminoácidos deduzida da proteína de fusão de variante BG de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* são mostradas em Figuras 12A, 12B, 12C, e 12D (SEQ ID NOs: 25 e 26, respectivamente).

Exemplo 10: Transformação de *Trichoderma reesei* RutC30 com pSaMe-F1

[00405] Frascos agitados contendo 25 ml de meio YP suplementado com glicose 2% e uridina 10 mM foram inoculados com 5 X 10^7 de esporos de *Trichoderma reesei* RutC30. Após incubação noturna por aproximadamente 16 horas a 27°C, 90 rpm, os micélios foram colhidos usando um Sistema de Filtração Descartável Acionado por Vácuo. Os micélios foram lavados duas vezes em 100 ml de água deionizada e duas vezes em sorbitol 1,2 M. Protoplastos foram gerados como descrito em Exemplo 6.

[00406] Dois microgramas de pSaMe-F1 DNA linearizado com *Pme*I, 100 µl de protoplastos *Trichoderma reesei* RutC30, e PEG (4000) 50% foram misturados e incubados por 30 minutos na temperatura ambiente. Então 3 ml de STC foram adicionados e o conteúdo foi derramado sobre uma placa COVE suplementada com uridina 10 mM. A placa foi então incubada a 28°C. Transformantes começaram a aparecer pelo dia 6 e foram recolhidos para placas COVE2 para crescimento a 28°C e por 6 dias. Vinte e dois transformantes de *Trichoderma reesei* foram recuperados.

[00407] Transformantes foram cultivados em frascos agitados em meio indutor de celulase, e atividade de beta-glicosidase foi medida como descrito em Exemplo 6. Numerosos transformantes pSaMe-F1 produziram atividade de beta-glicosidase. Um transformante, designado *Trichoderma reesei* SaMeF1-9, produziu a quantidade mais alta de beta-glicosidase, e teve o dobro da atividade de uma cepa expressando variante de beta-glicosidase de

Aspergillus oryzae (Exemplo 9).

[00408] Atividade de endoglicanase foi ensaiada usando um ensaio de sobrecamada sobre carbóxi-metil-celulose (CMC) de acordo com Beguin, 1983, *Analytical Biochem.* 131(2): 333-336. Cinco µg de proteína total das amostras de caldo (aquelas tendo a atividade mais alta de beta-glicosidase) foram diluídas em Tampão de Amostra Nativo (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e corridas sobre um gel CRITERION® 8-16% Tris-HCl (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando tampão de corrida 10X Tris/glicina (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e o gel foi aplicado sobre o topo de uma placa contendo carbóxi-metil-celulose (CMC) 1%. Após incubação de 1 hora a 37°C, o gel foi corado com Vermelho Congo 0,1% por 20 minutos. A placa foi então descorada usando NaCl 1 M com o propósito de identificar regiões de clareira indicativas de atividade de endoglicanase. As zonas de clareira estavam visíveis, uma zona superior ao redor de 110 kDa e uma zona inferior ao redor de 25 kDa. O tamanho da fusão de proteína predito da endoglicanase V de *Humicola insolens* e variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* é 118 kDa se as duas proteínas não estão clivadas e permanecem como um polipeptídeo único; glicosilação do domínio core de endoglicanase V individual e da beta-glicosidase causa migração das proteínas individuais em mw mais alto do que predito da sequência primária. Se as duas proteínas são clivadas então os tamanhos preditos para o domínio core de endoglicanase V de *Humicola insolens* é 24 kDa e 94 kDa para variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*. Visto que houve uma zona de clareira em 110 kDa este resultado indicou que minimamente uma população de proteína de fusão de endoglicanase e beta-glicosidase permanece intacta em uma proteína grande única. A zona de clareira inferior mais provavelmente representa a atividade de endoglicanase endógena, e possivelmente adicionalmente resulta da clivagem parcial do domínio core de endoglicanase V de *Humicola insolens* da beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*.

[00409] Os resultados demonstraram que core de endoglicanase V de *Humicola insolens* estava ativo embora estivesse ligado na beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae*. Em adição, o aumento em atividade de beta-glicosidase pareceu resultar da secreção aumentada de proteína relativa à eficiência de secreção do beta-glicosidade de não-fusão. Pela ligação da sequência de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* no core de endoglicanase V de *Humicola insolens* eficientemente secretado, foi secretada mais beta-glicosidase.

Exemplo 11: Construção de vetor pSaMe-FX

[00410] Plasmídeo pSaMe-FX foi construído por modificação de pSaMe-F1. Plasmídeo pSaMe-F1 foi digerido com *Bst* Z17 e *Eco* RI para gerar um fragmento de 1 kb que continha a sequência codificadora de variante BG41 de beta-glicosidase e um fragmento de 9,2 kb contendo o restante do plasmídeo. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE e o fragmento 9,2 kb foi excisado e purificado usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK® de acordo com as instruções do fabricante. Plasmídeo pSMai135 também foi digerido com *Bst* Z17 e *Eco* RI para gerar um fragmento de 1 kb contendo bases homólogas à sequência codificadora de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* e um fragmento de 8,5 kb contendo o restante do plasmídeo. O fragmento de 1 kb foi isolado e purificado como acima.

[00411] Os fragmentos de 9,2 kb e 1 kb foram combinados em uma reação de ligação usando um Kit de Ligação Rápida de DNA seguindo as instruções do fabricante para produzir pSaMe-FX, que é idêntico ao pSaMe-F1 exceto que continha a sequência codificadora madura de beta-glicosidase de tipo selvagem em vez de a sequência codificadora de variante.

[00412] Células Competentes de *E. coli* SURE® (Stratagene, La Jolla, CA, USA) foram transformadas com o produto de ligação. Identidade do construto foi confirmada por sequenciamento de DNA de plasmídeos

purificados de *E. coli* transformada demonstrando a presença do promotor de gene de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei*, a sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*, a sequência core de endoglicanase V de *Humicola insolens*, a sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*, sequência codificadora madura de beta-glicolase de *Aspergillus oryzae*, e a sequência de terminador de gene de celobioidrolase I de *Trichoderma reesei*. Um clone contendo o plasmídeo recombinante foi designado pSaMe-FX (Figura 12). A sequência de DNA e a sequência de aminoácidos deduzida da proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* são mostradas em Figuras 14A, 14B, 14C, e 14D (SEQ ID NOs: 27 e 28, respectivamente).

Exemplo 12: Transformação e expressão de transformantes de *Trichoderma*

[00413] O construto pSaMe-FX foi linearizado com *Pme* I e transformado na *Trichoderma reesei cepa RutC30* como descrito em Exemplo 10. Um total de 63 transformantes foi obtido de uma única transformação. Transformantes foram cultivados em frascos agitados em meio indutor de celulase, e atividade de beta-glicosidase foi medida como descrito em Exemplo 6. Numerosos transformantes pSaMe-FX produziram atividade de beta-glicosidase. Um transformante designado SaMe-FX16 produziu a quantidade dobrada de atividade de beta-glicosidase comparado com *Trichoderma reesei* SaMeF1-9 (Exemplo 10).

Exemplo 13: Análise de transformantes de *Trichoderma reesei*

[00414] Uma proteína de fusão foi construída como descrito em Exemplo 9 pela fusão do core de endoglicanase V de *Humicola insolens* (contendo sua própria sequência de sinal nativa) com a sequência codificadora madura de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* ligada na sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*. Este construto de fusão resultou em um aumento dobrado em atividade secretada de beta-

glicosidase comparado com a sequência codificadora madura de variante BG41 de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* ligada na sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*. Um segundo construto de fusão foi preparado como descrito em Exemplo 11 consistindo do core de endoglicanase V de *Humicola insolens* (contendo sua própria sequência de sinal) fusionado com a sequência codificadora de beta-glisosidase de tipo selvagem de *Aspergillus oryzae* ligada na sequência de sinal de endoglicanase V de *Humicola insolens*, e isto causou uma melhoria ainda maior em atividade de beta-glicosidase. A cepa transformada com a fusão de tipo selvagem teve o dobro da atividade secretada de beta-glicosidase em relação à cepa transformada com a fusão de variante BG41 de beta-glicosidase.

Exemplo 14: Clonagem da sequência codificadora de proteína de fusão de beta-glicosidase em um vetor de expressão de *Aspergillus oryzae*

[00415] Dois iniciadores de oligonucleotídeo sintéticos, mostrados abaixo, foram planejados para amplificar por PCR a matriz de leitura aberta de comprimento total de pSaMeFX codificador da proteína de fusão de beta-glicosidase.

Iniciador Direto de PCR:

5’-GGACTGCGCAGCATGCGTTC-3’ (SEQ ID NO: 69)

Iniciador Inverso de PCR:

5’-AGTTAATTAATTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3’ (SEQ ID NO: 70)

[00416] Letras em negrito representam a sequência codificadora. O "G" sublinhado no iniciador direto representa uma mudança de base introduzida para criar um sítio de restrição *Sph* I. A sequência restante contém a identidade de sequência comparada com os sítios de inserção de pSaMeFX. A sequência sublinhada no iniciador inverso representa um sítio de restrição *Pac* I adicionado para facilitar a clonagem no vetor de expressão pAlLo2 (WO 04/099228).

[00417] Cinquenta picomoles de cada um dos iniciadores acima foram

usados em uma reação PCR contendo 50 ng de pSaMeFX DNA, 1X Tampão de Amplificação *Pfx*, 6 µl de mistura 10 mM de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 2,5 unidades de PLATINUM® *Pfx* DNA Polimerase, e 1 µl de $MgSO_4$ 50 mM em um volume final de 50 µl. Um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 foi usado para amplificar o fragmento programado para 1 ciclo a 98°C por 2 minutos; e 35 ciclos cada um a 96°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, e 68°C por 3 minutos. Após os 35 ciclos, a reação foi incubada a 68°C por 10 minutos e então esfriada a 10°C até adicionalmente processada. Um produto de reação PCR de 3,3 kb foi isolado sobre um gel de GTG-agarose 0,8% (Cambrex Bioproducts One Meadowlands Plaza East Rutherford, NJ, USA) usando tampão TAE e 0,1 µg de brometo de etídio por ml. O DNA foi visualizado com o auxílio de um DARK READER™ (Clare Chemical Research, Dolores, CO, USA) para evitar mutações induzidas por UV. Uma banda de DNA de 3,3 kb foi excisada com uma lâmina de barbear descartável e purificada com um ULTRAFREE®-DA spin cup (Millipore, Billerica, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

[00418] O produto de PCR de 3,3 kb PCR purificado foi clonado em um vetor pCR®4Blunt-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quatro microlitros do produto de PCR purificado foram misturados com 1 µl de uma solução de cloreto de sódio 2 M e 1 µl do vetor TOPO®. A reação foi incubada na temperatura ambiente por 15 minutos e então 2 µl da reação foram usados para transformar células de *E. coli* Quimicamente Competentes One Shot® TOP10 de acordo com as instruções do fabricante. Três alíquotas de 83 µl cada da reação de transformação foram espalhadas sobre três placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml e incubadas das a 37°C.

[00419] Oito colônias recombinantes foram usadas para inocular culturas contendo 3 ml de meio LB suplementado com 100 µg de ampicilina por ml. Plasmídeo DNA foi preparado destas culturas usando um

BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Clones foram analisados por digestão com enzima de restrição com *Pac* I. Plasmídeo DNA de cada clone foi digerido com *Pac* I e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,1% usando tampão TAE. Todos os oito clones tiveram o padrão de digestão de restrição esperado e clones 5, 6, 7, e 8 foram selecionados para serem sequenciados para confirmar que não houve mutações no inserto clonado Análise de sequência de suas extremidades 5' e 3' indicou que todos os 4 clones tiveram a sequência correta. Clones 5 e 7 foram selecionados para sequenciamento adicional. Ambos os clones foram sequenciados para valores de Phred Q de maiores do que 40 para garantir que não houve erros induzidos por PCR. Foi mostrado que clones 5 e 7 têm a sequência esperada e clone 5 foi selecionado para re-clonagem em pAlLo2.

[00420] Plasmídeo DNA de clone 5 foi linearizado por digestão com *Sph* I. O clone linearizado teve extremidade cegada pela adição de 1,2 µl de uma mistura 10 mM de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP e 6 unidades de T4 DNA polimerase (New England Bioloabs, Inc., Ipswich, MA, USA). A mistura foi incubada a 12°C por 20 minutos e então a reação foi interrompida pela adição de 1 µl de EDTA 0,5 M e aquecimento a 75°C por 20 minutos para inativar a enzima. Um fragmento de 3,3 kb codificador da proteína de fusão de beta-glicosidase foi purificado por eletroforese em gel e ultrafiltração como descrito acima.

[00421] O vetor pAlLo2 foi linearizado por digestão com *Nco* I. O vetor linearizado teve então extremidade cegada pela adição de 0,5 µl de uma mistura 10 mM de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP e uma unidade de DNA polimerase I. A mistura foi incubada a 25°C por 15 minutos e então a reação foi interrompida pela adição de 1 µl de EDTA 0,5 M e aquecimento a 75°C por 15 minutos para inativar a enzima. Então o vetor foi digerido com *Pac* I. O vetor de extremidade cegada foi purificado por eletroforese em gel e ultrafiltração como descrito acima.

[00422] Clonagem do fragmento de 3,3 kb codificador da proteína de fusão de beta-glicosidase em vetor pAlLo2 linearizado e purificado foi realizada com um Kit de Ligação Rápida. Uma amostra de 1 µl da reação foi usada para transformar células de *E. coli* XL10 SOLOPACK® Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Após o período de recuperação, duas alíquotas de 100 µl da reação de transformação foram plaqueadas sobre duas placas 2X YT de 150 mm suplementadas com 100 µg de ampicilina por ml e incubadas durante a noite a 37°C. Um conjunto de oito clones recombinante putativos foi selecionado aleatoriamente das placas de seleção e plasmídeo DNA foi preparado de cada um usando um BIOROBOT® 9600. Clones 1-4 foram selecionados para sequenciamento com iniciadores específicos para pAlLo2 a fim de conformar que a junção de vetor/inserto tinha a sequência correta. Clone 3 teve uma junção perfeita de vetor/inserto e foi designado pAlLo47 (Figura 15).

[00423] Com o propósito de criar uma cepa de expressão livre de marcador, uma digestão por endonuclease de restrição foi realizada para separar o gene *blaA* que concede resistência ao antibiótico ampicilina do restante do construto de expressão. Trinta microgramas de pAlLo47 foram digeridos com *Pme* I. O DNA digerido foi então purificado por eletroforese em gel de agarose gel como descrito acima. Uma banda de DNA de 6,4 kb contendo o construto de expressão mas faltante do gene *blaA* foi excisada com uma lâmina de barbear e purificada com Kit de Extração de Gel QIAQUICK®.

Exemplo 15: Expressão do gene de fusão de *Humicola insolens/Aspergillus oryzae cel45A-cel3A* em *Aspergillus oryzae* JaL355

[00424] Protoplastos de *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 00/240694) foram preparados de acordo com o método de Christensen *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422. Dez microlitros do construto de expressão purificado de Exemplo 14 foram usados para transformar protoplastos de

Aspergillus oryzae JaL355. A transformação de *Aspergillus oryzae* JaL355 deu aproximadamente 90 transformantes. Cinquenta transformantes foram isolados em placas PDA individuais e incubados por cinco dias a 34ºC.

[00425] Quarenta e oito placas de esporos confluentes foram lavadas com 3 ml de TWEEN® 80 0,01%e a suspensão de esporos foi usada para inocular 25 ml de meio MDU2BP em frascos de vidro agitados de 125 ml. Culturas de transformante foram incubadas a 34ºC com agitação constante a 200 rpm. Após 5 dias, alíquotas de 1 ml de cada cultura foram centrifugadas a 12.000 *x g* e seus sobrenadantes foram colhidos. Cinco µl de cada sobrenadante foram misturados com um volume igual de 2X tampão de carregamento (beta-mercapto-etanol 10%) e carregado sobre um gel de Tris-Glicina SDS-PAGE 8%-16% de 1,5 mm e corado com corante de proteína BIO-SAFE® Coomassie Blue G250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Perfis de SDS-PAGE dos caldos de cultura mostraram que 33 dos 48 transformantes foram capazes de expressar uma proteína nova com um peso molecular aparente muito próximo do esperado de 118 kDa. Transformante 21 produziu o melhor rendimento e foi selecionado para estudos.

Exemplo 16: Isolamento de esporo único de transformante 21 de *Aspergillus oryzae* JaL355

[00426] Esporos de transformante 21 de *Aspergillus oryzae* JaL355 foram espalhados sobre uma placa PDA e incubados por cinco dias a 34ºC. Uma área pequena da placa de esporos confluentes foi lavada com 0,5 ml de TWEEN® 80 0,01% para ressuspender os esporos. Uma alíquota de 100 µl da suspensão de esporos foi diluída para um volume final de 5 ml com TWEEN® 80 0,01%. Com o auxílio de um hemocitômetro a concentração de esporos foi determinada e diluída para uma concentração final de 0,1 esporo por microlitro. Uma alíquota de 200 µl da diluição de esporos foi espalhada sobre placas de meio mínimo de 150 mm e incubada por 2-3 dias a 34ºC. Colônias emergentes foram excisadas das placas e transferidas para placas

PDA e incubadas por 3 dias a 34ºC. Então os esporos foram espalhados através das placas e incubados de novo por 5 dias a 34ºC.

[00427] As placas de esporos confluentes foram lavadas com 3 ml de TWEEN® 80 0,01% e a suspensão de esporos foi usada para inocular 25 ml de meio MDU2BP em frascos de vidro de 125 ml agitados. Culturas de esporo único foram incubadas a 34ºC com agitação constante a 200 rpm. Após 5 dias, uma alíquota de 1 ml de cada cultura foi centrifugada a 12.000 *x g* e seus sobrenadantes colhidos. Cinco µl de cada sobrenadante foram misturados com um volume igual de 2X tampão de carregamento (beta-mercapto-etanol 10%) e carregado sobre gel de Tris-Glicina SDS-PAGE 8%-16% de 1,5 mm corados com corante de proteína BIO-SAFE® Commassie Blue G250. Perfis de SDS-PAGE dos caldos de cultura mostraram que todos os oito transformantes foram capazes de expressar a proteína de fusão de beta-glicosidase em níveis muito altos e uma das culturas designada *Aspergillus oryzae* JaL355AlLo47 produziu o melhor rendimento..

Exemplo 17: Construção de pCW087

[00428] Dois iniciadores de oligonucleotídeo sintéticos mostrados abaixo foram planejados para amplificação por PCR de um gene de polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus* GH61A a partir do plasmídeo pDZA2-7 (WO 2005/074656). O iniciador direto resulta em uma extremidade 5' cega e o iniciador inverso incorpora o sítio *Pac* I na extremidade 3’.

Iniciador Direto:

5’-ATGTCCTTTTCCAAGATAATTGCTACTG-3’ (SEQ ID NO: 71)

Iniciador Inverso:

5’-GCTTAATTAACCAGTATACAGAGGAG-3’ (SEQ ID NO: 72)

[00429] Cinquenta picomoles de cada um dos iniciadores acima foram usados em uma reação PCR consistindo de 50 ng de pDZA2-7, 1 µl de mistura 10 mM de dATP, dTTP, dGTP, e dCTP, 5 µl de 10X Tampão de ACCUTAQ™ DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e 5

unidades de ACCUTAQ™ DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), em um volume final de 50 µl. Um EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 foi usado para amplificar o fragmento de DNA programado para 1 ciclo a 95°C por 3 minutos; 30 ciclos cada um a 94°C por 45 segundos, 55°C por 60 segundos, e 72°C por 1 minuto a 30 segundos. Após os 25 ciclos, a reação foi incubada a 72°C por 10 minutos e então esfriada a 4°C até processamento adicional. A extremidade 3’ do fragmento de PCR de *Thermoascus aurantiacus* GH61A foi digerida usando *Pac* I. O produto de digestão foi purificado usando um kit MINELUTE™ Reaction Cleanup Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

[00430] O fragmento GH61A foi diretamente clonado em pSMai155 (WO 2005/074647) utilizando um sítio *Nco* I cego na extremidade 5' e um sítio *Pac* I na extremidade 3’. Plasmídeo pSMai155 foi digerido com *Nco* I e *Pac* I. O sítio *Nco* I foi então tornado cego usando enzimas Klenow para preencher o sítio *Nco* I rebaixado 5’. A reação de Klenow consistiu de 20 µl da mistura de reação de digestão pSma155 mais dNTPs 1 mM e 1 µl de enzima Klenow que foi incubada brevemente na temperatura ambiente. O plasmídeo pSMai155 recém-linearizado foi purificado usando um MINELUTE™ Reaction Cleanup Kit de acordo com as instruções do fabricante. Estas reações resultaram na criação de uma extremidade cega 5' e um sítio 3’ *Pac* I compatível com o fragmento GH61A recém-gerado. O fragmento GH61A foi então clonado em vetor de expressão pSMai155 usando um Kit de Ligação Rápida de DNA (Roche, Indianapolis, IN, USA) seguindo as instruções do fabricante. Células Competentes de *E. coli* de Grau de Subclonagem XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) foram transformadas com o produto de ligação. Identidade do construto foi confirmada por sequenciamento de DNA da sequência codificadora GH61A dos plasmídeos purificados de *E. coli* transformada. Um clone de *E. coli*

contendo o plasmídeo recombinante foi designado pCW087-8.

Exemplo 18: Construção de pSaMe-Ta61A

[00431] Vetor de expressão pSaMe-Ta61 foi construído por digestão de plasmídeo pMJ09 (WO 2005/056772), que hospeda o marcador selecionável *amdS*, com *Nsi* I, que liberou um fragmento *amdS* de 2,7 kb. O fragmento *amdS* de 2,7 kb foi então isolado por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE e purificado usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK®.

[00432] Vetor de expressão pCW087 foi digerido com *Nsi* I e um fragmento de 4,7 kb foi isolado por eletroforese em gel de agarose 1,0% usando tampão TAE e purificado usando um Kit de Extração de Gel QIAQUICK®. O fragmento *amdS* de 2,7 kb foi então ligado no fragmento de vetor de 4,7 kb, usando T4 DNA ligase (Roche, Indianapolis, IN, USA) de acordo com o protocolo do fabricante, para criar o vetor de expressão pSaMe-Ta61A. Plasmídeo pSaMe-Ta61A compreende o terminador e o promotor de gene de celobioidrolase I (CEL7A) de *Trichoderma reesei* operacionalmente ligados na sequência codificadora madura de *Thermoascus aurantiacus* GH61A.

Exemplo 19: Construção de *Trichoderma reesei* cepa SaMe-MF268

[00433] Uma co-transformação foi utilizada para introduzir plasmídeos pSaMe-FX e pSaMe-Ta61A em *Trichoderma reesei* RutC30. Plasmídeos pSaMe-FX e pSaMe-Ta61A foram introduzidos em *Trichoderma reesei* RutC30 por transformação mediada por PEG (Penttila *et al.*, 1987, *supra*). Cada plasmídeo continha o gene *amdS* de *Aspergillus nidulans* para permitir que transformantes crescessem sobre acetamida como uma única fonte de nitrogênio.

[00434] *Trichoderma reesei* RutC30 foi cultivado a 27°C e 90 rpm em 25 ml de meio YP suplementado com 2% (p/v) de glicose e uridina 10 mM

por 17 horas. Micélios foram colhidos por filtração usando um Sistema de Filtração Descartável Acionado por Vácuo e lavados duas vezes com água deionizada e duas vezes com sorbitol 1,2 M. Protoplastos foram gerados por suspensão dos micélios lavados em 20 ml de sorbitol 1,2 M contendo 15 mg de GLUCANEX® (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) por ml e 0,36 unidade de quitinase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por ml e incubando por 15-25 minutos a 34°C com agitação cuidadosa a 90 rpm. Protoplastos foram colhidos por centrifugação por 7 minutos a 400 *x g* e lavados duas vezes com sorbitol 1,2 M frio. Os protoplastos foram contados usando um hemacitômetro e ressuspensos em STC para uma concentração final de 1 X 10^8 protoplastos por ml. Protoplastos em excesso foram armazenados em um Recipiente de Congelamento Cryo 1°C (Nalgene, Rochester, NY, USA) a -80°C.

[00435] Aproximadamente 4 μg de cada um dos plasmídeos pSaMe-FX e pSaMe-Ta61A foram digeridos com *Pme* I para facilitar a remoção do marcador de resistência a antibiótico, ampR. Após digestão com *Pme* I os fragmentos lineares foram corridos sobre um gel de agarose 1% usando tampão TAE para separar os vários fragmentos. Um fragmento de 7,5 kb de pSaMe-FX e um fragmento de 4,7 kb de pSaMe-Ta61A foram cortados do gel e purificados usando um Kit de Extração de Gel QIAquic de acordo com as instruções do fabricante. Estes fragmentos purificados contêm o cassete de marcador selecionável *amdS*, os promotor e terminador de gene *cbh1* de *Trichoderma reesei*; adicionalmente, o fragmento inclui o core EGV de *Humicola insolens* / sequência codificadora de fusão BG de *Aspergillus oryzae* ou a sequência codificadora de *T. aurantiacus* GH61A. Os fragmentos usados em transformação não continham marcadores de resistência a antibiótico, porque o fragmento *ampR* foi removido por esta etapa de purificação de gel. Os fragmentos purificados foram então adicionados em 100 μl de solução de protoplasto e misturados cuidadosamente, seguido por

260 µl de tampão PEG, misturados, e incubados na temperatura ambiente por 30 minutos. STC (3 ml) foi então adicionado e misturado e a solução de transformação foi plaqueada sobre placas COVE usando seleção de *amdS*. As placas foram incubadas a 28°C por 5-7 dias. Transformantes foram sub-cultivados sobre placas COVE2 e crescidos a 28°C.

[00436] Mais de 400 transformantes foram subcultivados sobre placas novas contendo acetamida e permitidos esporularem por 7 dias a 28°C.

[00437] Os transformantes de *Trichoderma reesei* foram cultivados em frascos agitadores de 125 ml com defletores contendo 25 ml de meio indutor de celulase em pH 6,0 inoculados com esporos dos transformantes e incubados a 28°C e 200 rpm por 5 dias. *Trichoderma reesei* RutC30 foi usado como um controle. Amostras de caldo de cultura foram removidas no dia 5. Um ml de cada caldo de cultura foi centrifugado a 15.700 *x g* por 5 minutos em uma microcentrífuga e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos.

[00438] SDS-PAGE foi realizado usando geles CRITERION® Tris-HCl (resolução de 5%) com o Sistema CRITERION®. Cinco µl de sobrenadantes de dia 5 (veja acima) foram suspensos em 2X concentração de Tampão de Amostra Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e fervidos na presença de 5% beta-mercapto-etanol por 3 minutos. As amostras de sobrenadante foram carregadas sobre um gel de poliacrilamida e submetidas à eletroforese com 1X Tris/Glicina/SDS como tampão de corrida (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). O gel resultante foi colorido com Corante Coomassie BIO-SAFE®. Transformantes mostrando expressão de ambos o polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus* GH61A e a proteína de fusão consistindo do core de endoglicanase V de *Humicola insolens* (Cel45A) fusionado com a beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* como visto por visualização das bandas sobre geles de SDS-PAGE foram então testados em reações de hidrólise PCS para identificar as cepas produtoras dos melhores caldos

hidrolíticos..

Exemplo 20: Identificação de *Trichoderma reesei* cepa SaMe-MF268

[00439] Os transformantes mostrando expressão de ambos o polipeptídeo de *Thermoascus aurantiacus* GH61A e a proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* foram cultivados em frascos agitadores de 125 ml com defletores contendo 25 ml de meio indutor de celulase em pH 6,0 inoculados com esporos dos transformantes e incubados a 28°C e 200 rpm por 5 dias.

[00440] Os caldos de cultura em frasco agitado foram centrifugados a 6000 *x g* e filtrados usando STERICUP™ EXPRESS™ (Millipore, Bedford, MA, USA) para 0,22 μm antes da hidrólise. A atividades dos caldos de cultura foi medidas pela sua capacidade para hidrolisar a PCS e produzir açúcares por um ensaio químico de suas extremidades redutoras..

[00441] Palhada de milho foi pré-tratada no U.S. Department of Energy National Renewable Energy Laboratory (NREL), Boulder, CO, USA, usando ácido sulfúrico diluído. As seguintes condições foram usadas para o pré-tratamento: 0,048 g de ácido sulfúrico / g de biomassa seca a 190ºC e 25% p/p de sólidos secos por cerca de 1 minuto. Os sólidos insolúveis em água na palhada de milho (PCS) pré-tratada continham 59,2% de celulose conforme determinado por um digesto limite de PCS para liberar glicose e celobiose. Antes da hidrólise enzimática, a PCS foi lavada com um volume grande de água duplamente deionizada; e o peso seco da PCS lavada com água encontrado foi de 17,73%..

[00442] PCS na quantidade de 1 kg foi suspensa em aproximadamente 20 litros de água duplamente deionizada e, após a sedimentação da PCS, a água foi decantada. Isto foi repetido até que a água de lavagem tivesse um pH acima de 4,0, em cujo momento os açúcares redutores foram mais baixos do que 0,06 g por litro. Para ensaios de volume pequeno (*e.g.*, 1 ml) a pasta

fluida sedimentada foi peneirada através de peneiras de Malha 100 para garantir capacidade de pipetação. Teor percentual em peso seco da PCS lavada conforme determinado por secagem da amostra em um forno a 105ºC por pelo menos 24 horas (até peso constante) e comparação com o peso úmido.

[00443] Hidrólise de PCS foi realizada em um volume de 1 ml em placas de 96 cavidades profundas (Axygen Scientific) seladas por calor por um selador de placa de laboratório automático ALPS 300™ (ABgene Inc., Rochester, NY, USA). Concentração de PCS foi 10 g por litro em acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Hidrólise de PCS foi realizada a 50ºC sem agitação exceto durante amostragem como descrito. Cada reação foi conduzida três vezes. Açúcares redutores liberados foram analisados pelo reagente hidrazida de ácido p-hidróxi-benzóico (PHBAH) como descrito abaixo.

[00444] Um volume de 0,8 ml de PCS (12,5 g por litro em água) foi pipetado em cada cavidade de placas de 96 cavidades profundas, seguido por 0,10 ml de acetato de sódio 0,5 M de pH 5,0, e então 0,10 ml de solução de enzima diluída para iniciar a reação com um volume de reação final de 1,0 ml e concentração de PCS de 10 g por litro. Placas foram seladas. A mistura reacional foi misturada por inversão da placa de cavidade profunda no início da hidrólise e antes do instante de tempo de retirada de cada amostra. Em cada instante de tempo de amostra a placa foi misturada e então a placa de cavidade profunda foi centrifugada (Sorvall® RT7 com rotor RTH-250) a 2000 rpm por 10 minutos antes de 20 µl de hidrolisado (sobrenadante) serem removidos e adicionados em 180 µl de NaOH 0,4% em uma microplaca de 96 cavidades. Esta solução terminada foi adicionalmente diluída na faixa apropriada de açúcares redutores, quando necessário. Os açúcares redutores liberados foram ensaiados pelo reagente hidrazida de ácido para-hidróxi-benzóico (PHBAH, Sigma, 4-hidróxi-benzi-hidrazida): 50 µl de reagente PHBAH (1,5%) foram misturados com 100 µl de amostra em uma placa de 96

cavidades de fundo-V THERMOWELL™ (Costar 6511), incubados sobre um bloco de aquecimento de placa a 95ºC por 10 minutos, e então 50 µl de água duplamente deionizada foram adicionados em cada cavidade, misturados e 100 µl foram transferidos para outra placa de 96 cavidades de fundo plano (Costar 9017) e absorbância foi liada em 410 nm. Açúcar redutor foi calculado usando uma curva de calibração de glicose sob as mesmas condições. Conversão percentual de celulose em açúcares redutores foi calculada como:

Conversão % = açúcares redutores (mg/ml) / (celulose adicionada (mg/ml) x 1,11)

O fator 1,11 corrige o ganho de peso em hidrólise de celulose para glicose

[00445] Após o teste de hidrólise de 1 ml de PCS, os candidatos de topo foram crescidos duas vezes em fermentadores de acordo com o seguinte protocolo. Cem ml de seguinte meio de frasco agitador foram adicionados em um frasco agitador de 500 ml. O meio em frasco agitador foi composto por litro de 20 g de dextrose, 10 g de sólidos de macerado de milho, 1,45 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2,08 g de KH_2PO_4, 0,36 g de $CaCl_2$, 0,42 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, e 0,42 ml de solução de metais traço. Solução de metais traço foi composta por litro de 216 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 58 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,4 g de H_3BO_3, e 336 g de ácido cítrico.

[00446] O frasco agitador foi inoculado com dois blocos de uma cultura de placa sólida e incubado a 28ºC em um agitador orbital a 200 rpm por 48 horas. Cinquenta ml do caldo do frasco agitador foram usados para inocular um vaso de fermentação de 3 litros contendo 1,8 litros de um meio de fermentação em batelada composto por litro de 30 g de celulose, 4 g de dextrose, 10 g de sólidos de macerado de milho, 3,8 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2,8 g de KH_2PO_4, 2,64 g de $CaCl_2$, 1,63 g de $MgSO_4,7H_2O$, 1,8 ml de antiespumante, e 0,66 ml de solução de metais traço. Solução de metais traço foi composta por

litro de 216 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 58 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,4 g de H_3BO_3, e 336 g de ácido cítrico. Meio de alimentação de fermentação foi composto de dextrose e celulose, foi dosado em um taxa de 0 a 4 g/l/h por um período de 165 horas. O vaso de fermentação foi mantido em uma temperatura de 28ºC e pH como controlado para um ponto de ajuste de 4,75 +/- 0,1. Ar foi adicionado no vaso em uma vazão de 1 vvm e o caldo foi agitado por um impulsor Rushton girando a de 1100 a 1300 rpm.

[00447] A concentração de proteína total foi determinada e os caldos foram re-testados em reações de hidrólise de PCS de 50 g como descrito abaixo. Diluições de enzima foram recém-preparadas antes do experimento a partir de soluções de enzima de estoque, que estavam armazenadas a 4ºC.

[00448] Hidrólise de PCS foi conduzida usando frascos Erlenmeyer de 125 ml com tampa de rosca (VWR, West Chester, PA, USA) usando uma massa de reação total de 50 g de acordo com NREL Laboratory Analytical Protocol #008. Neste protocolo a hidrólise de PCS (aproximadamente 11,4% em PCS e 6,8% de celulose em tampão aquoso de acetato de sódio 50 mM de pH 5,0) foi realizada usando carregamentos de proteína diferentes (expressados como mg de proteína por grama de celulose) das amostras de caldo de fermentação de 2 litros, descritas acima. Teste da capacidade de hidrólise de PCS foi realizado a 50°C com agitação orbital a 150 rpm usando uma Incubadora INNOVA® 4080 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Alíquotas foram tiradas durante o curso da hidrólise a 72, 120, e 168 horas e centrifugadas, e o líquido sobrenadante foi filtrado usando uma membrana MULTISCREEN® HV de 0,45 μm (Millipore, Billerica, MA, USA) por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos usando uma centrífuga de placa SORVALL® RT7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Quando não imediatamente usadas, as alíquotas de açúcar filtradas foram congeladas a -20°C. Concentrações de açúcar das amostras diluídas em

H_2SO_4 0,005 M foram medidas após eluição por H_2SO_4 0,005 M em uma vazão de fluxo de 0,4 ml por minuto de uma coluna AMINEX® HPX-87H de 4,6 mm x 250 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 65°C com quantificação por integração de sinais de glicose e de celobiose a partir da detecção de índice de refração usando um CHEMSTATION® AGILENT® 1100 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) calibrado por amostras de açúcar puro. Os equivalentes resultantes foram usados para calcular a percentagem de conversão de celulose para cada reação.

[00449] O grau conversão de celulose em açúcares glicose mais celobiose (conversão, %) foi calculado usando a seguinte equação:

Conversão (%) = (glicose+celobiose x 1,053) (mg/ml) x 100 x 162 / (celulose (mg/ml) x 180) = (glicose+celobiose x 1,053) (mg/ml) x 100 / (celulose (mg/ml) x 1,111)

[00450] Nesta equação o fator 1,111 reflete o ganho de peso na conversão de celulose em glicose, e o fator 1,053 reflete o ganho de peso na conversão de celobiose em glicose.

[00451] Os resultados das reações de hidrólise de PCS no ensaio em frasco de 50 descrito acima são mostrados em Tabela 1. Uma cepa que produziu o caldo de desempenho mais alto foi designada *Trichoderma reesei* SaMe-MF268.

Tabela 1: Conversão percentual em açúcares em instante de tempo de 168 horas

	Conversão percentual (glicose mais celobiose) para carga de proteína	
ID Caldo - Nome da Cepa	2,5 mg/g celulose	4,0 mg/g celulose
XCL-461-SaMe-MF268	66,29	80,08
XCL-465-SaMe-MF268	69,13	82,80
XCL-462-SaMe-MF330	62,98	77,99
XCL-466-SaMe-	63,34	77,90

MF330		
XCL-463-SaMe-MF377	64,03	78,45
XCL-467-SaMe-MF377	64,19	79,06

Exemplo 21: Preparação de caldos de *Trichoderma reesei* contendo polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* e proteína de fusão de beta-glicosidase de *Apergillus oryzae*

[00452] Amostras de caldo de fermentação, preparadas como descrito em Exemplo 20, foram clarificadas de fragmentos celulares por centrifugação por aproximadamente 20 minutos a 9.500 *x g*. Amostras de caldo clarificado foram então filtradas através de uma membrana MILLEX® GP Express™, poli(éter-sulfona), 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, USA). As amostras de caldo filtrado foram então dessalinizadas usando uma Coluna de Dessalinização HIPREP™ 26/10 (AKTA™, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Concentrações de proteína do material dessalinizado foram determinadas usando um Kit de Ensaio de Proteína BCA™ (Pierce, Rockford, IL, USA) no qual albumina de soro bovino foi usada como uma proteína padrão e cálculo foi feito para proteína em caldo filtrado. Alíquotas foram tio analisadas sobre geles CRITERION™ SDS-PAGE 8-16% (Bio-Rad, Hercules, CA; 200 V por 1 hora) nos quais padrões de peso molecular PRECISION PLUS PROTEIN™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) foram incluídos included. Geles foram corados para proteína usando Corante Coomassie BIO-SAFE™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e dessalinizados usando água deionizada. Estimativas da quantidade de polipeptídeo GH16A de *Thermoascus aurantiacus* de proteína de fusão compreendendo a proteína core GH45 de *Humicola insolens* e a beta-glicosidase de *Apergillus oryzae* foram feitas por quantificação de varreduras de geles corados ou por tamanho de pico após análise por eletroforese em capilar EXPERION™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Exemplo 22: Aumento em atividade celulolítica de caldo de

Trichoderma reesei contendo proteína de fusão de beta-glicosidase de *Apergillus oryzae* quando combinado íons de metal e polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus*

[00453] Palhada de milho foi pré-tratada no U.S. Department of Energy National Renewable Energy Laboratory (NREL) usando ácido sulfúrico diluído. As seguintes condições foram usadas para o pré-tratamento: ácido sulfúrico 1,4% em peso a 195ºC por 4,5 minutos. De acordo com digestão limite com enzimas celulase excessivas, os sólidos insolúveis em água na palhada de milho pré-tratada (PCS) continham 59,2% de celulose. Antes da hidrólise enzimática, a PCS foi lavada com um volume grande de água deionizada até que o ácido solúvel e os açúcares fossem removidos. O peso seco de PCS lavada com água encontrado foi de 19,16%.

[00454] Hidrólise de PCS foi conduzida usando um frasco Erlenmeyer de 125 ml de tampa roscada (VWR, West Chester, PA, USA) utilizando uma massa de reação total de 50 g de acordo com NREL Laboratory Analytical Protocol #008. Neste protocolo hidrólise de PCS (aproximadamente 11,3% em PCS e 6,7% de cellulose em tampão acetato de sódio aquoso 50 mM de pH 5,0) foi realizada usando cargas de proteína diferentes (expressadas como mg de proteína por grama de celulose) do caldo de fermentação de *Trichoderma reesei* caldo contendo o polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* tendo atividade celulolítica intensificadora e proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* com e sem adição de íons de metais divalentes de concentração final de 10 mM na forma mostrada em Tabela 1. Teste de capacidade de hidrólise de PCS foi conduzida a 50°C com agitação orbital a 150 rpm usando uma Incubadora INNOVA® 4080 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Alíquotas foram tiradas durante o curso da hidrólise a 72 e 120 horas. Alíquotas foram centrifugadas, e o líquido sobrenadante foi filtrado usando uma membrana MULTISCREEN® HV de 0,45 μm por centrifugação a 2.000 rpm por 15 minutos usando uma centrífuga

de placa SORVALL® RT7. Quando não usadas imediatamente, as alíquotas de açúcar filtradas foram congeladas a -20°C. Concentrações de açúcar de amostras diluídas em H_2SO_4 0,005 M foram medidas após diluição por H_2SO_4 0,005 M em uma vazão de fluxo de 0,4 ml por minuto de uma coluna AMINEX® HPX-87H de 4,6 mm x 250 a 65°C com quantificação por integração do sinal de glicose e celobiose da detecção de índice de refração usando um CHEMSTATION®, AGILENT® 1100 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) calibrado por amostras de açúcar puro. Os equivalentes resultantes foram usados para calcular a percentagem de conversão de celulose para cada reação.

[00455] O grau de conversão de celulose em açúcares glicose mais celobiose (conversão, %) foi calculado usando a seguinte equação:

Conversão % = (glicose+celobiose x 1,053) (mg/ml) x 100 x 162 / (celulose (mg/ml) x 180) = (glicose+celobiose x 1,053) (mg/ml) x 100 / (celulose (mg/ml) x 1,111)

[00456] Nesta equação o fator 1,111 reflete o ganho de peso em conversão de celulose em glicose, e o fator 1,053 reflete o ganho de peso em conversão de celobiose em glicose. Celulose em PCS foi determinada por um digesto limite de PCS para liberar glicose e celobiose.

[00457] Diluições de enzima foram recém-preparadas antes de cada experimento a partir de soluções de estoque de enzima, que foram armazenadas a 4°C.

[00458] Os resultados mostrados em Tabela 2 demonstraram que a adição de $MnSO_4$ 10 mM aumentou a conversão em glicose acima daquela observada pelas quantidades equivalentes de caldo de fermentação sozinho em níveis de proteína de 4 a 8 mg/g de celulose. Similarmente, $CaCl_2$, $MgCl_2$, ou $CoCl_2$ adicionados a 10 mM aumentaram a conversão em glicose acima daquela obtida pelas quantidades equivalentes de caldo de fermentação sozinho em níveis de proteína de 4 a 8 mg/g de celulose. Adição de outros

sais de metais divalentes tais como $ZnCl_2$ ou $FeSO_4$ 10 mM, ou a adição de EDTA 10 mM, um quelante de cátions divalentes, diminuiu o rendimento de glicose e celobiose. Os resultados para hidrólise de 72 h são mostrados em Figura 16.

[00459] A adição de $MnSO_4$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, ou $CoCl_2$ 10 mM nas soluções contendo celulase aumentou, portanto, o rendimento de glicose e de celobiose sob hidrólise de palhada de milho pré-tratada (PCS) com ácido em comparação com outros sais de metais.

Tabela2

Experimento	Mistura de enzimas e metal	Teor real de biomassa % (p/p)	Teor real de celulose % (p/p)	Proteína total real mg/g celulose	Conversão em 72 h	Conversão em 120 h
1	SaMe MF268	11,32	6,70	4,00	74,10	84,62
2	SaMe MF268	11,32	6,70	6,00	84,59	91,94
3	SaMe MF268	11,32	6,70	8,00	88,68	95,20
7	SaMe MF268 Ca++	11,32	6,70	4,00	74,79	86,14
8	SaMe MF268 Ca++	11,32	6,70	6,00	85,77	95,11
9	SaMe MF268 Ca++	11,32	6,70	8,00	89,54	96,29
10	SaMe MF268 Mg++	11,32	6,70	4,00	75,31	87,08
11	SaMe MF268 Mg++	11,32	6,70	6,00	86,99	95,12
12	SaMe MF268 Mg++	11,32	6,70	8,00	90,49	97,56
13	SaMe MF268	11,32	6,70	4,00	79,30	86,77

	Mn++					
14	SaMe MF268 Mn++	11,33	6,70	6,00	91,65	95,23
15	SaMe MF268 Mn++	11,32	6,70	8,00	98,03	98,70
16	SaMe MF268 Zn++	11,32	6,70	4,00	56,00	63,38
17	SaMe MF268 Zn++	11,32	6,70	6,00	65,79	75,03
18	SaMe MF268 Zn++	11,32	6,70	8,00	74,88	84,22
19	SaMe MF268 Fe++	11,32	6,70	4,00	33,80	35,83
20	SaMe MF268 Fe++	11,32	6,70	6,00	42,50	44,88
21	SaMe MF268 Fe++	11,32	6,70	8,00	49,74	50,21
22	SaMe MF268 Co++	11,33	6,70	4,00	75,98	85,88
23	SaMe MF268 Co++	11,32	6,70	6,00	87,86	94,33
24	SaMe MF268 Co++	11,32	6,70	8,00	94,26	97,05
25	SaMe MF268 EDTA	11,31	6,69	4,00	57,94	65,94
26	SaMe MF268 EDTA	11,32	6,70	6,00	67,67	74,35
27	SaMe MF268 EDTA	11,32	6,70	8,00	72,85	77,69

Exemplo 23: O aumento em atividade celulolítica em caldo dessalinizado de *Trichoderma reesei* contendo beta-glicosidase de *Apergillus oryzae* quando combinado com íons de metal é específico para misturas contendo polipeptídeo GH61A

[00460] O polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* tendo atividade celulolítica foi recombinantemente produzido em *Aspergillus oryzae* JaL250 de acordo com WO 2005/074656. Caldo fúngico expressando beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* e celulases de *Trichoderma reesei* foi recombinantemente produzido em *Trichoderma reesei* cepa SMA135-04. Fermentações foram realizadas para cada uma destas proteínas como descrito abaixo.

[00461] Para fermentações envolvendo *Aspergillus oryzae*, 100 ml de um meio de frasco agitador foram adicionados em um frasco agitador de 500 ml. O meio do frasco agitador foi composto por litro de 50 g de sacarose, 10 g de KH_2PO_4, 0,5 g de $CaCl_2$, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de K_2SO_4, 2 g de uréia, 10 g de extrato de levedo, 2 g de ácido cítrico, e 0,5 ml de soluções de metais traço. A solução de metais traço foi composta por litro de 13,8 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 14,3 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 8,5 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, e 3 g de ácido cítrico. O frasco agitador foi inoculado com dois blocos de uma cultura de placa sólida de *Aspergillus oryzae* e incubado a 34ºC em um agitador orbital a 200 rpm por 24 horas. Cinquenta ml do caldo do frasco agitador foram usados para inocular um vaso de fermentação de 3 litros contendo 1,8 litros de um meio de fermentação de batelada composto por litro de 10 g de extrato de levedo, 24 g de sacarose, 5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2 g de KH_2PO_4, 0,5 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 g de $MgSO_4$,$7H_2O$, 1 g de ácido cítrico, 2 g de K_2SO_4, 0,5 ml de antiespumante, e 0,5 ml de solução de metais traço. Solução de metais traço foi composta por litro de 13,8 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 14,3 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 8,5 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2,5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, e 3 g de ácido cítrico. Meio de alimentação de fermentação foi composto de maltose e

antiespumante. O meio de alimentação de fermentação foi dosado em uma taxa de 0 a 4,4 g/l/h por um período de 185 horas. O vaso de fermentação foi mantido em uma temperatura de 34ºC e pH foi controlado para um ponto de ajuste de 6,1 +/- 0,1. Ar foi adicionado no vaso em uma vazão de 1 vvm e o caldo foi agitado por impulsor de Rushton girando a de 1.100 a 1.300 rpm.

[00462] Fermentações envolvendo *Trichoderma reesei* foram realizadas como descrito em Exemplo 20.

[00463] Amostras de caldo bruto foram clarificadas de fragmentos celulares por centrifugação por aproximadamente 20 minutos a 9.500 *x g*. Amostras de clado clarificado foram então filtradas através de uma membrana MILLEX® GP Express™, poli(éter-sulfona), 0,22 µm. As amostras de caldo filtrado foram então dessalinizadas usando uma Coluna de Dessalinização HIPREP™ 26/10. Concentrações de proteína do material dessalinizado foram determinadas usando um Kit de Ensaio de Proteína BCA™ no qual albumina de soro bovino foi usada como uma proteína padrão e cálculo foi feito para proteína em caldo filtrado. Alíquotas foram tipicamente analisadas em geles CRITERION™ SDS-PAGE 8-16% (200 V por 1 hora) no qual padrões de peso molecular PRECISION PLUS PROTEIN™ foram incluídos. Geles foram corados para proteína usando Corante de Coomassie BIO-SAFE™ (e descorados usando água deionizada). Proteínas também foram preparadas por dessalinização como acima para remover íons de metal dissolvidos em caldos de fermentação e estão indicadas por prefixo ds como visto em Tabelas 3 e 4.

[00464] Hidrólise de PCS foi conduzida usando frascos Erlenmeyer de 125 ml de tampa roscada com uma massa de reação total de 50 g de acordo com NREL Laboratory Analytical Protocol #008. Neste protocolo hidrólise de PCS (aproximadamente 11,3% em PCS e 6,7% de celulose em tampão de acetato de sódio aquoso 50 mM de pH 5,0) foi realizada usando carga de proteína total constante (expressada como mg de enzima por grama de celulose) de um caldo de fermentação de *Trichoderma reesei* contendo beta-

glicosidase de *Aspergillus oryzae* com e sem adição de polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* com e sem concentração final de 1 mM de íons de metais divalentes na forma mostrada em Tabela 2. Teste de capacidade de hidrólise de PCS foi realizado como descrito em Exemplo 22. O grau de conversão de celulose em acúcares glicose mais celobiose (conversão %) foi calculado usando a equação descrita em Exemplo 22.

[00465] Diluições de enzima foram recém-preparadas antes de cada experimento a partir de soluções de enzima de estoque, que foram armazenadas a 4°C.

[00466] Os resultados mostrados em Tabela 3 demonstraram que a adição de cátions divalentes 1 mM sozinhos não aumentou a conversão de glicose acima daquela obtida por quantidades equivalentes de caldo de fermentação sem inclusão de polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* tendo atividade celulolítica intensificadora. Similarmente, inclusão do polipeptídeo GH61A sem adição de cátions de metais divalentes não aumentou a conversão de glicose. Os resultados para hidrólise de 72 horas estão plotados em Figura17.

[00467] A adição de $MnSO_4$ ou $CaCl_2$ 1 mM em soluções contendo celulase com polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* tendo atividade celulolítica intensificadora aumentou, portanto, o rendimento de glicose e celobiose sob hidrólise de palhada de milho pré-tratada (PCS) com ácido. O aumento foi dependente da presença de polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus*. A adição de 1 mM de outros metais tais como Zn++ e Fe++ ou quelação de metais por EDTA1 mM reduziu o rendimento de glicose e celobiose sob hidrólise de palhada de milho pré-tratada (PCS) com ácido.

Tabela 3

Experimento	Mistura de enzimas e metal	Conversão em 72 h	Conversão em 120 h
56	dsSMA135	54,42	62,65
58	dsSMA135 Ca++	55,48	61,52

Experimento	Mistura de enzimas e metal	Conversão em 72 h	Conversão em 120 h
60	dsSMA135 Mn++	45,19	60,11
62	dsSMA135 EDTA	49,65	59,52
64	dsSMA135 Zn++	37,61	43,59
65	dsSMA135 + GH61A	56,97	76,41
66	dsSMA135 + GH61A Ca++	63,23	77,79
67	dsSMA135 + GH61A Mn++	67,43	84,02
68	dsSMA135 + GH61A EDTA	49,03	57,49
69	dsSMA135 + GH61A Zn++	47,39	58,01

Exemplo 24: O aumento em atividade celulolítica de caldo de *Trichoderma reesei* contendo proteína de fusão de beta-glicosidase de *Apergillus oryzae* e polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* quando combinado com $MnSO_4$ e $MgCl_2$

[00468] Polipeptídeo GH16A de *Thermoascus aurantiacus* tendo atividade celulolítica intensificadora e uma proteína de fusão contendo o core GH45A de *Humicola insolens* com beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* foi recombinantemente produzido em *Trichoderma reesei* SaMe MF268 como descrito em Exemplo 20.

[00469] Amostras de caldo bruto foram clarificadas de fragmentos celulares por centrifugação por aproximadamente 20 minutos a 9.500 *x g*. Amostras de clado clarificado foram então filtradas usando uma membrana MILLEX® GP Express™, poli(éter-sulfona), 0,22 µm. As amostras de caldo filtrado foram então dessalinizadas usando uma Coluna de Dessalinização HIPREP™ 26/10. Concentrações de proteína do material dessalinizado foram determinadas usando um Kit de Ensaio de Proteína BCA™ no qual albumina de soro bovino foi usada como uma proteína padrão e cálculo foi feito para proteína em caldo filtrado. Alíquotas foram tipicamente analisadas em geles CRITERION™ SDS-PAGE 8-16% (200 V por 1 hora) no qual padrões de peso molecular PRECISION PLUS PROTEIN™ foram incluídos. Geles

foram corados para proteína usando Corante de Coomassie BIO-SAFE™ (e descorados usando água deionizada). Proteínas também foram preparadas por dessalinização como acima para remover íons de metal dissolvidos em caldos de fermentação.

[00470] Hidrólise de PCS foi conduzida usando frascos Erlenmeyer de 125 ml de tampa roscada com uma massa de reação total de 50 g de acordo com NREL Laboratory Analytical Protocol #008. Neste protocolo hidrólise de PCS (aproximadamente 11,3% em PCS e 6,7% de celulose em tampão de acetato de sódio aquoso 50 mM de pH 5,0) foi realizada usando carga de proteína total constante (expressada como mg de enzima por grama de celulose) de um caldo de fermentação dessalinizado ou não-dessalinizado de *Trichoderma reesei* contendo proteína de fusão de beta-glicosidase de *Aspergillus oryzae* e sem polipeptídeo GH61A de *Thermoascus aurantiacus* com concentração final crescente de 1 mM de $MnSO_4$ e $MgCl_2$ como mostrado em Tabela 4. Teste de capacidade de hidrólise de PCS foi realizado como descrito em Exemplo 22. O grau de conversão de celulose em açúcares glicose mais celobiose (conversão %) foi calculado usando a equação descrita em Exemplo 22.

[00471] Diluições de enzima foram recém-preparadas antes de cada experimento a partir de soluções de enzima de estoque, que foram armazenadas a 4°C.

[00472] Os resultados mostrados em Tabela 4 demonstraram que a adição de concentração crescente de $MnSO_4$ e $MgCl_2$ de 0,001, 0,01, 0,1, 1, ou 10 mM aumentou a taxa de conversão obtida pelas quantidades equivalentes de *Trichoderma reesei* SaMe MF268 sem $MnSO_4$. Similarmente, adição de $MnSO_4$ em concentrações crescentes de 0,001, 0,01, 0,1, 1, ou 10 mM mostrou nenhum aumento até aproximadamente 1 mM quando adicionada em caldo de fermentação dessalinizado de *Trichoderma reesei* SaMe MF268. Os resultados para hidrólise de 72 horas são mostrados em

Figura 18.

[00473] A adição de $MnSO_4$ e $MgCl_2$ para uma concentração final de 0,001, 0,01, 0,1, 1, ou 10 mM de cada íon de metal em soluções contendo caldo de fermentação de *Trichoderma reesei* SaMe MF268 aumentou, portanto, o rendimento de glicose e celobiose sob hidrólise de palhada de milho pré-tratada (PCS) com ácido. A adição de $MnSO_4$ e $MgCl_2$ para uma concentração final de 1 mM ou 10 mM em soluções contendo caldo de fermentação dessalinizado de *Trichoderma reesei* SaMe MF268, portanto, o rendimento de glicose e celobiose sob hidrólise de palhada de milho pré-tratada (PCS) com ácido.

Tabela4

Experimento	Mistura de enzimas e metal	Teor real de biomassa % (p/p)	Teor real de celulose % (p/p)	Proteína total real mg/g celulose	Conversão em 72 h	Conversão em 120 h
46	SaMe MF268	11,32	6,70	4,03	69,20	80,61
47	SaMe MF268 íons 0,01 mM	11,32	6,70	4,03	73,56	82,98
48	SaMe MF268 íons 0,1 mM	11,31	6,69	4,03	74,59	84,82
49	SaMe MF268 íons 1 mM	11,21	6,63	4,03	75,62	84,56
50	SaMe MF268 íons 10 mM	10,29	6,09	4,03	76,02	84,45
51	dsSaMe MF268	11,32	6,70	4,02	70,93	79,11
52	dsSaMe	11,32	6,70	4,02	71,16	83,63

	MF268 íons 0,01 mM					
53	dsSaMe MF268 íons 0,1 mM	11,31	6,69	4,02	70,88	83,30
54	dsSaMe MF268 íons 1 mM	11,21	6,63	4,02	74,90	83,22
55	dsSaMe MF268 íons 10 mM	10,29	6,09	4,02	74,17	79,01

Depósitos de material biológico

[00474] Os seguintes materiais biológicos têm sido depositados sob os termos do Tratado de Budapeste na Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, e receberam os seguintes números de acesso:

Depósito	Número de Acesso	Data de Depósito
E. coli cepa pEJG120	NRRL B-30699	19 de Dezembro de 2003
E. coli cepa pTter61C	NRRL B-30823	21 de Janeiro de 2005
E. coli cepa pTter61D	NRRL B-30812	21 de Janeiro de 2005
E. coli cepa pTter61E	NRRL B-30814	21 de Janeiro de 2005
E. coli cepa pTter61G	NRRL B-30811	21 de Janeiro de 2005
E. coli cepa pDZA2-7	NRRL B-30704	20 de Janeiro de 2004
E. coli cepa pTr3337	NRRL B-30878	20 de Setembro de 2005
E. coli TOP10 (pEJG113)	NRRL B-30695	17 de Outubro de 2003
E. coli TOP10 pKKAB	NRRL B-30860	8 de Julho de 2005
NN049573	DSM 14240	19 de Abril de 2001

[00475] As cepas têm sido depositadas sob condições que garantem que o acesso às culturas estará disponível durante a pendência deste pedido de patente para uma pessoa determinada pelo Comissário de Patentes e Marcas a ser designado para o mesmo sob 37 C.F.R. §1,14 e 35 U.S.C. §122. Os

depósitos representam culturas substancialmente puras das cepas depositadas. Os depósitos estão disponíveis conforme exigido para leis de patente estrangeiras em países nos quais contra-partes do presente pedido, ou sua progênie estão depositadas. Contudo, deve ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para a prática da presente invenção em derrogação dos direitos de patente concedidos pela ação governamental.

[00476] A invenção aqui descrita e reivindicada não é limitada em escopo pelos aspectos específicos aqui revelados, porque estes aspectos são intencionados como ilustrações de vários aspectos da invenção. Quaisquer aspectos equivalentes são intencionados para estarem dentro do escopo desta invenção. De fato, várias modificações da invenção em adição àquelas aqui mostradas e descritas se tornarão evidentes para aquelas pessoas experientes na arte a partir da descrição precedente. Tais modificações também são intencionadas para caírem dentro do escopo das reivindicações anexadas. No caso de conflito, a presente revelação incluindo definições controlará.

[00477] Várias referências são aqui citadas, cujas revelações são incorporadas como referências em suas totalidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a atividade de um polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora, caracterizado pelo fato de compreender: adicionar um cátion de metal divalente ativador solúvel em uma composição compreendendo o polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de preferivelmente 0,001 mM a 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel, em que o cátion de metal divalente ativador solúvel é selecionado do grupo consistindo de Mn^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, e uma combinação dos mesmos;

em que o dito polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora é representado pela SEQ ID NO: 2; aminoácidos 18 a 240 da SEQ ID NO: 4; aminoácidos 20 a 258 da SEQ ID NO: 6; aminoácidos 1 a 226 da SEQ ID NO: 8; aminoácidos 20 a 304 da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO:14.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mn^{++}.

3. Método para degradar ou converter um material contendo celulose, caracterizado pelo fato de compreender: tratar o material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma composição de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de preferivelmente 0,001 mM a 50 mM,

em que o cátion de metal divalente ativador solúvel é selecionado do grupo que consiste de Mn^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, e uma combinação dos mesmos,

em que o dito polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora é representado pela SEQ ID NO: 2; aminoácidos 18 a 240 da SEQ ID NO: 4; aminoácidos 20 a 258 da SEQ ID NO: 6; aminoácidos 1 a 226 da SEQ ID NO: 8; aminoácidos 20 a 304 da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO:14.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mn^{++}.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende tratar o material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma beta-glicosidase.

6. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender tratar o material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma ou mais enzimas selecionadas do grupo consistindo de uma hemicelulase, esterase, protease, lacase, peroxidase, ou uma mistura das mesmas.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender suplementar a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel para manter a concentração eficaz do cátion de metal divalente ativador solúvel em preferivelmente 0,001 mM a 50 mM.

8. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender recuperar o material contendo celulose degradado.

9. Método para produzir um produto de fermentação, caracterizado pelo fato de compreender: (a) sacarificar um material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma composição de enzimas celulolíticas compreendendo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora e de um cátion de metal divalente

ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de preferivelmente 0,001 mM a 50 mM; (b) fermentar o material contendo celulose sacarificado de etapa (a) com um ou mais microorganismos fermentadores para produzir o produto de fermentação; e (c) recuperar o produto de fermentação da fermentação, em que o cátion de metal divalente ativador solúvel é selecionado do grupo que consiste de Mn^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, e uma combinação dos mesmos,

em que o dito polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora é representado pela SEQ ID NO: 2; aminoácidos 18 a 240 da SEQ ID NO: 4; aminoácidos 20 a 258 da SEQ ID NO: 6; aminoácidos 1 a 226 da SEQ ID NO: 8; aminoácidos 20 a 304 da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO:14.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mn^{++}.

11. Método de acordo a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender tratar o material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma beta-glicosidase.

12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender tratar o material contendo celulose com uma quantidade eficaz de uma ou mais enzimas selecionadas do grupo consistindo de uma hemicelulase, esterase, protease, lacase, peroxidase, ou uma mistura das mesmas.

13. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender suplementar a concentração do cátion de metal divalente ativador solúvel para manter a concentração eficaz do cátion de metal divalente ativador solúvel a preferivelmente 0,001 mM a 50 mM.

14. Composição de enzimas celulolíticas, caracterizada pelo fato de compreender um polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica

intensificadora e um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de preferivelmente 0,001 mM a 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose por uma composição de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel, em que o cátion de metal divalente ativador solúvel é selecionado do grupo que consiste de Mn^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, e uma combinação dos mesmos,

em que o dito polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora é representado pela SEQ ID NO: 2; aminoácidos 18 a 240 da SEQ ID NO: 4; aminoácidos 20 a 258 da SEQ ID NO: 6; aminoácidos 1 a 226 da SEQ ID NO: 8; aminoácidos 20 a 304 da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO:14.

15. Composição de enzimas celulolíticas de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mn^{++}.

16. Composição, caracterizada pelo fato de compreender um polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora e um cátion de metal divalente ativador solúvel, sendo que o cátion de metal divalente ativador solúvel está presente em uma concentração eficaz de preferivelmente 0,001 mM a 50 mM durante degradação ou conversão de um material contendo celulose e a presença do cátion de metal divalente ativador solúvel e do polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora aumenta a degradação ou conversão do material contendo celulose pelas composições de enzimas celulolíticas comparado com o polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora sem o cátion de metal divalente ativador solúvel,

em que o cátion de metal divalente ativador solúvel é selecionado do grupo que consiste de Mn^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, Ca^{++}, e uma combinação dos mesmos,

em que o dito polipeptídeo GH61 tendo atividade celulolítica intensificadora é representado pela SEQ ID NO: 2; aminoácidos 18 a 240 da SEQ ID NO: 4; aminoácidos 20 a 258 da SEQ ID NO: 6; aminoácidos 1 a 226 da SEQ ID NO: 8; aminoácidos 20 a 304 da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO:14.

17. Composição de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o cátion de metal divalente ativador solúvel é Mn^{++}.

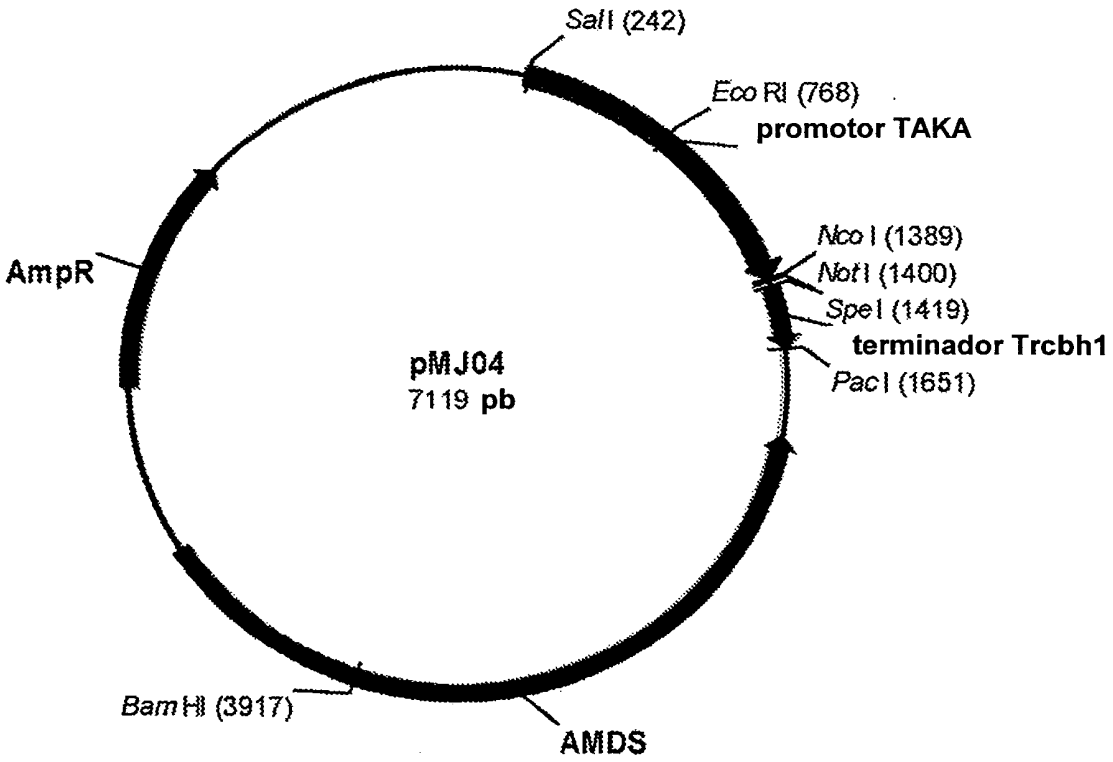

SalI (242)
EcoRI (768)
promotor TAKA
NcoI (1389)
NotI (1400)
SpeI (1419)
terminador Trcbh1
PacI (1651)
AmpR
pMJ04
7119 pb
BamHI (3917)
AMDS

Fig. 1

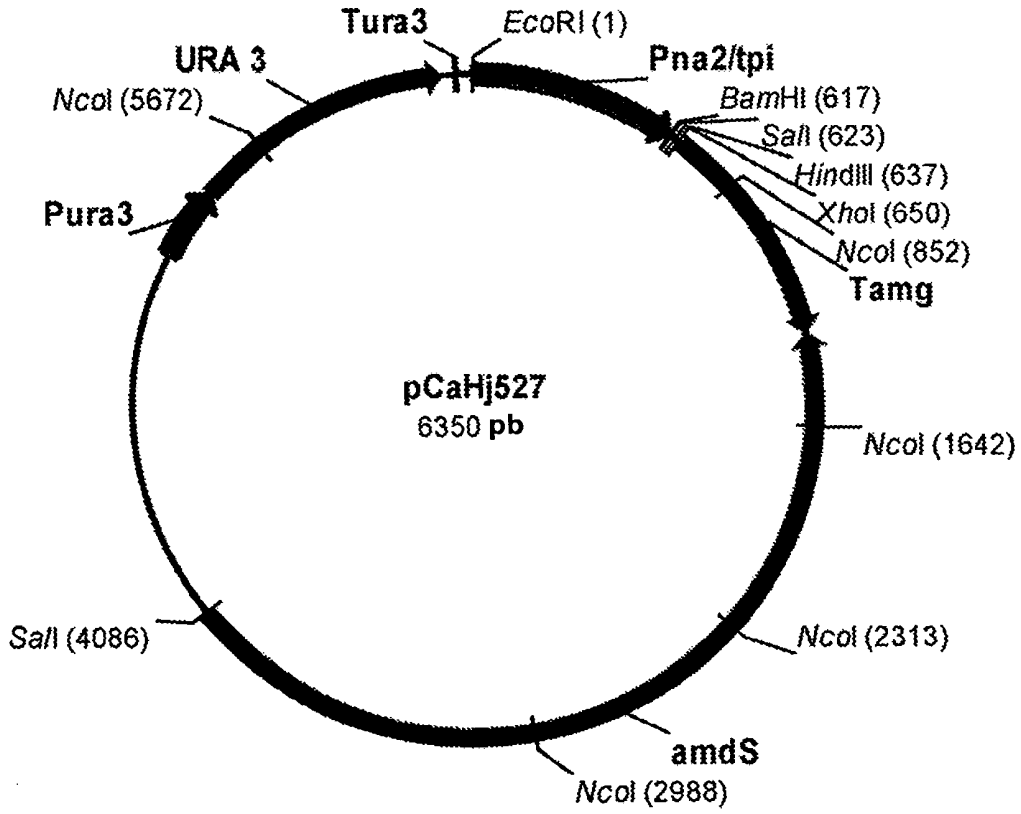

Tura3
EcoRI (1)
URA 3
Pna2/tpi
NcoI (5672)
BamHI (617)
SalI (623)
HindIII (637)
XhoI (650)
NcoI (852)
Pura3
Tamg
pCaHj527
6350 pb
NcoI (1642)
SalI (4086)
NcoI (2313)
amdS
NcoI (2988)

Fig. 2

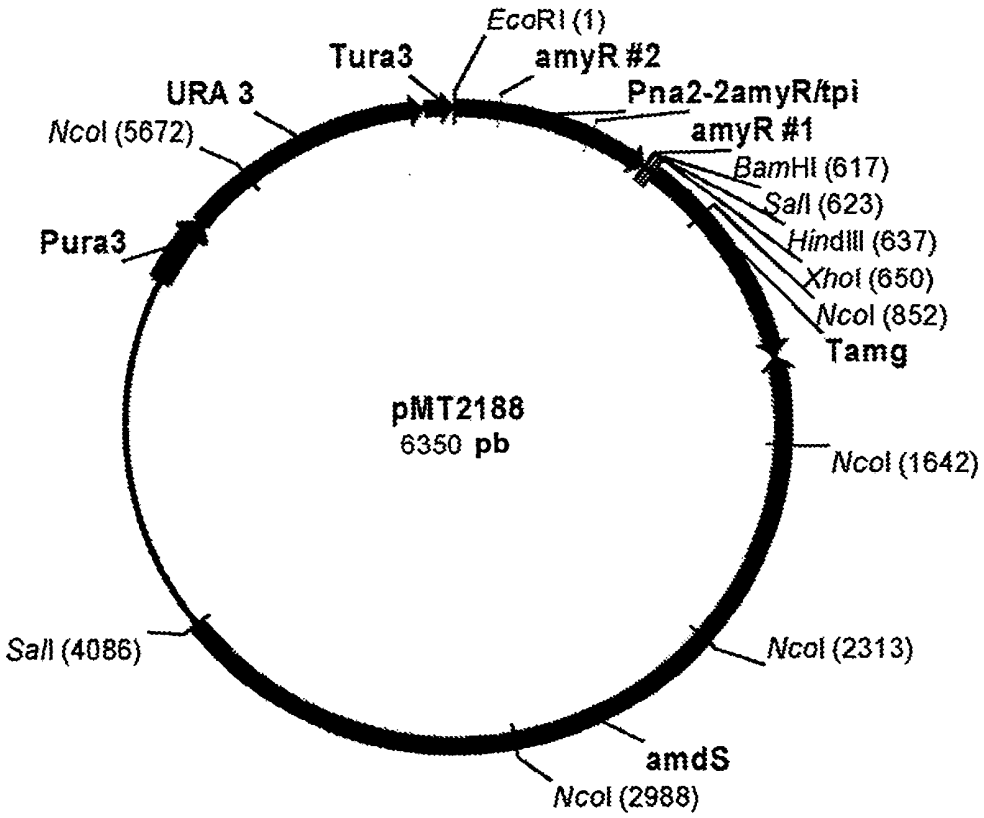

EcoRI (1)
Tura3
amyR #2
URA 3
Pna2-2amyR/tpi
NcoI (5672)
amyR #1
BamHI (617)
SalI (623)
HindIII (637)
Pura3
XhoI (650)
NcoI (852)
Tamg
pMT2188
6350 pb
NcoI (1642)
SalI (4086)
NcoI (2313)
amdS
NcoI (2988)

Fig. 3

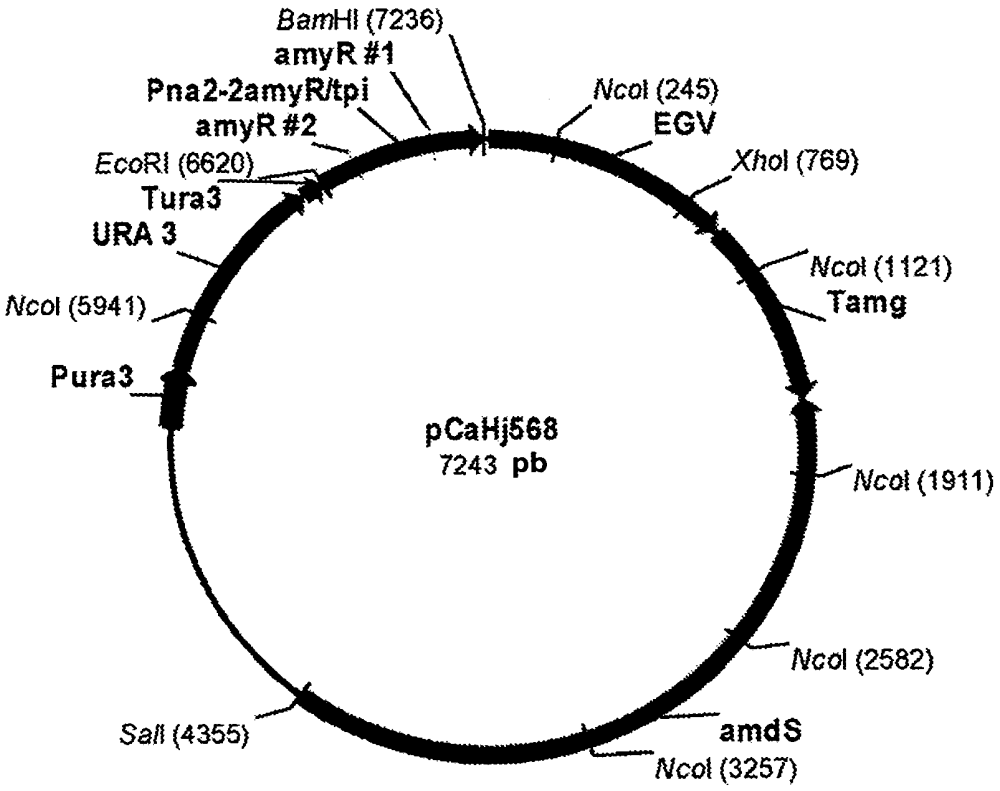

BamHI (7236)
amyR #1
Pna2-2amyR/tpi
amyR #2
EcoRI (6620)
Tura3
URA 3
NcoI (5941)
Pura3
NcoI (245)
EGV
XhoI (769)
NcoI (1121)
Tamg
NcoI (1911)
NcoI (2582)
amdS
NcoI (3257)
SalI (4355)
pCaHj568
7243 pb

Fig. 4

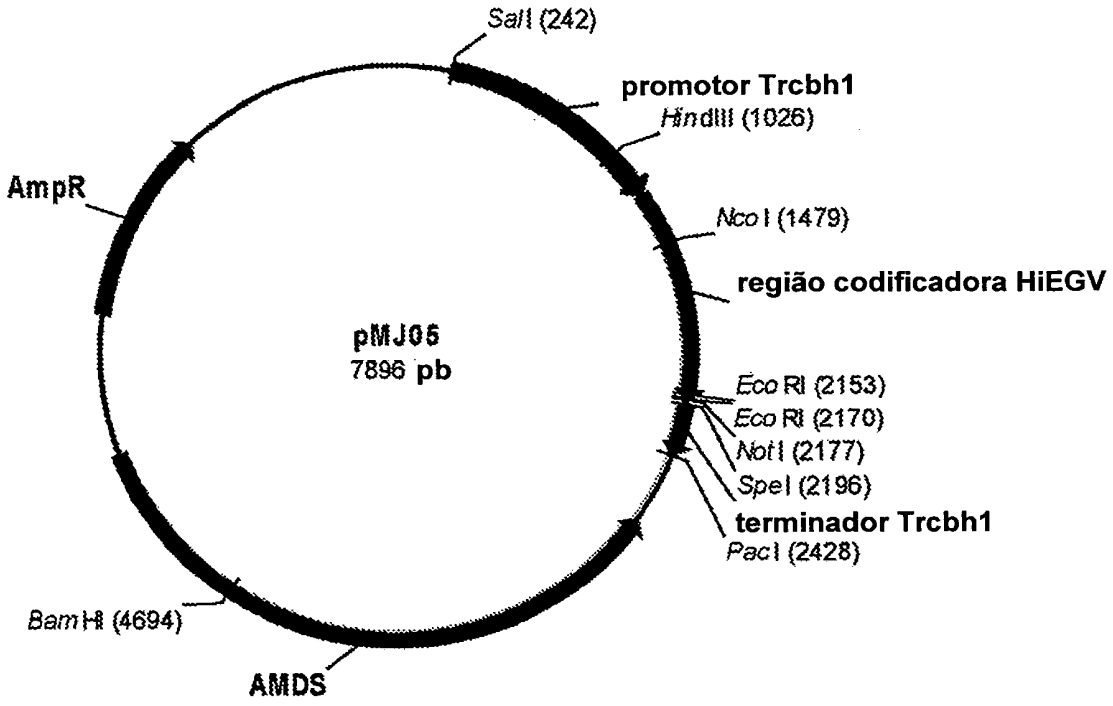

SalI (242)
promotor Trcbh1
HindIII (1026)
AmpR
NcoI (1479)
região codificadora HiEGV
pMJ05
7896 pb
EcoRI (2153)
EcoRI (2170)
NotI (2177)
SpeI (2196)
terminador Trcbh1
PacI (2428)
BamHI (4694)
AMDS

Fig. 5

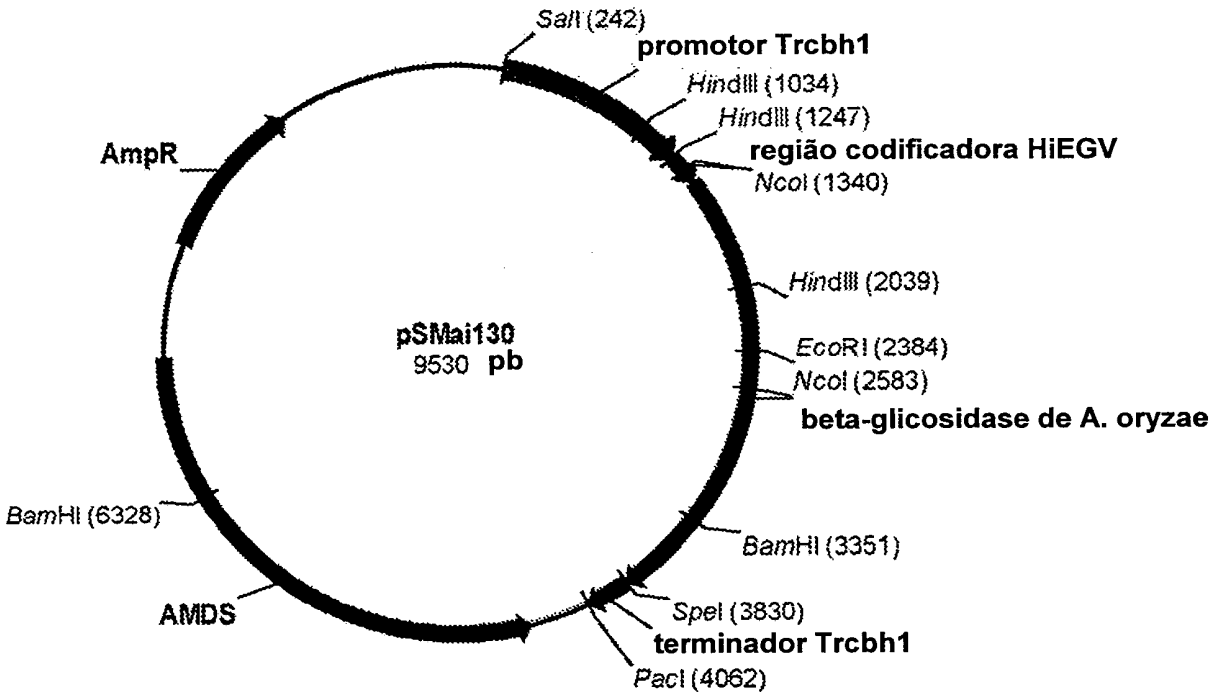

SalI (242)
promotor Trcbh1
HindIII (1034)
HindIII (1247)
região codificadora HiEGV
NcoI (1340)
HindIII (2039)
EcoRI (2384)
NcoI (2583)
beta-glicosidase de A. oryzae
BamHI (3351)
SpeI (3830)
terminador Trcbh1
PacI (4062)
AMDS
BamHI (6328)
AmpR
pSMai130
9530 pb

Fig. 6


ATG AAG CTT GGT TGG ATC GAG GTG GCC GCA TTG GCG GCT GCC TCA GTA GTC AGT GCC
M K L G W I E V A A L A A A S V V S A

Fig. 7

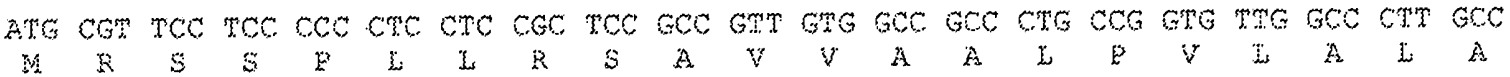

ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CGC TCC GCC GTT GTG GCC GCC CTG CCG GTG TTG GCC CTT GCC
M R S S P L L R S A V V A A L P V L A L A

Fig. 8

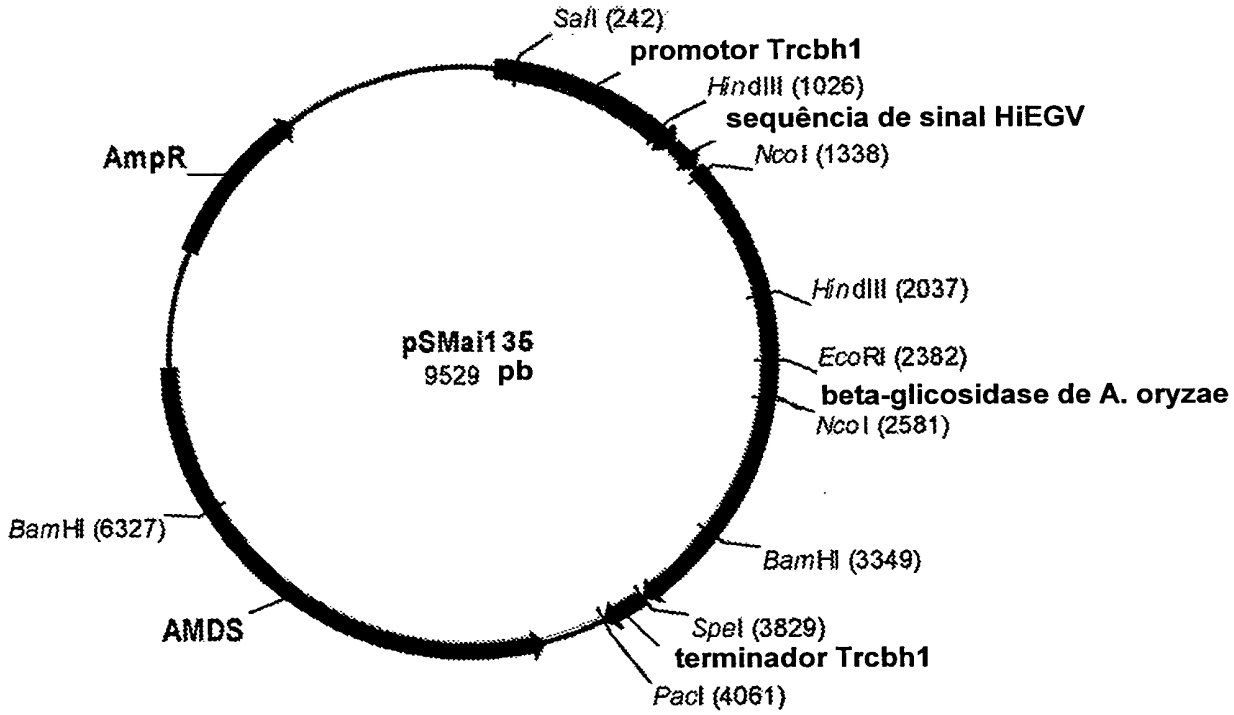

SalI (242)
promotor Trcbh1
HindIII (1026)
sequência de sinal HiEGV
NcoI (1338)
AmpR
HindIII (2037)
pSMai135
9529 pb
EcoRI (2382)
beta-glicosidase de A. oryzae
NcoI (2581)
BamHI (6327)
BamHI (3349)
AMDS
SpeI (3829)
terminador Trcbh1
PacI (4061)

Fig. 9

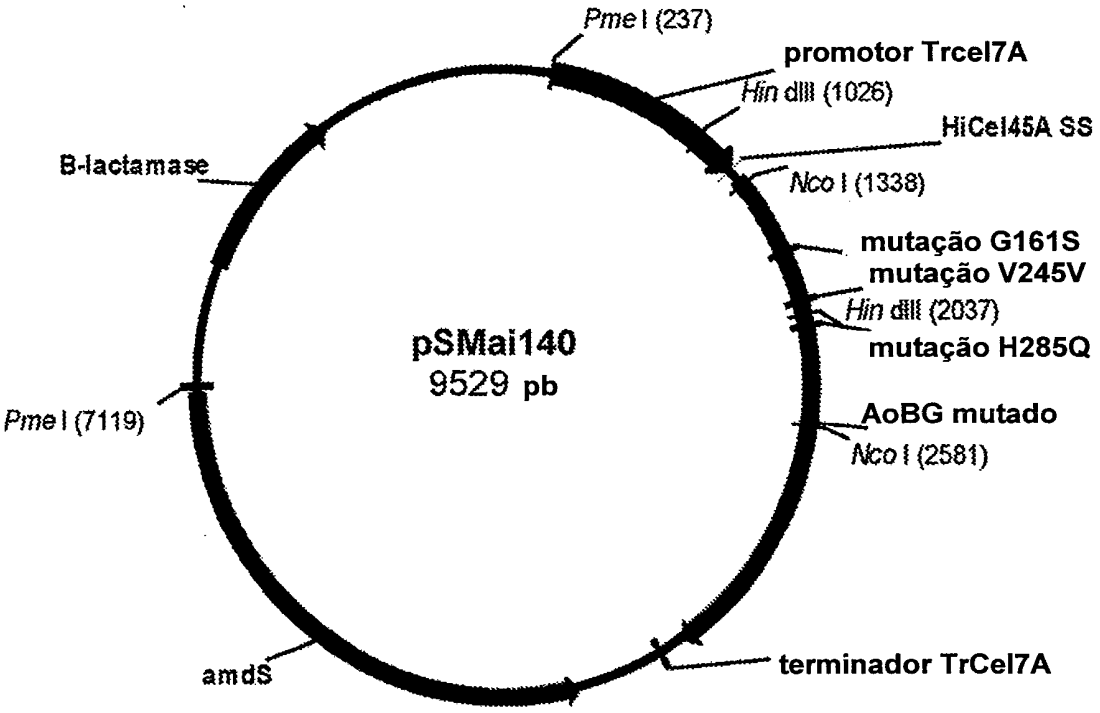

PmeI (237)
promotor Trcel7A
HinDIII (1026)
HiCel45A SS
NcoI (1338)
mutação G161S
mutação V245V
HinDIII (2037)
mutação H285Q
AoBG mutado
NcoI (2581)
terminador TrCel7A
amdS
PmeI (7119)
B-lactamase
pSMai140
9529 pb

Fig. 10

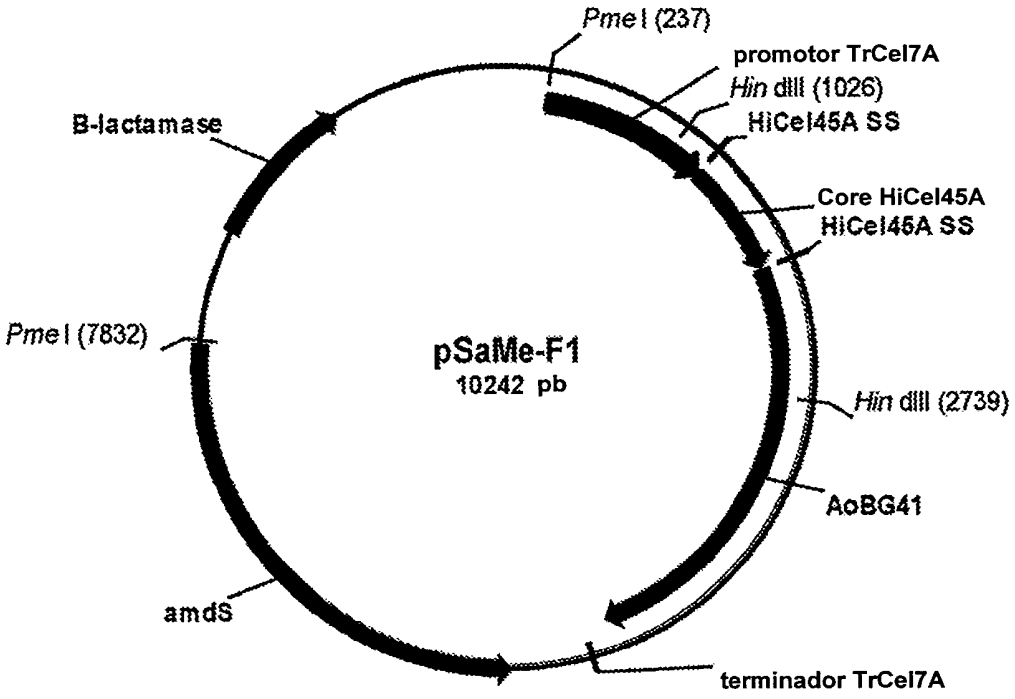

PmeI (237)
promotor TrCel7A
Hin dIII (1026)
HiCel45A SS
Core HiCel45A
HiCel45A SS
Hin dIII (2739)
AoBG41
terminador TrCel7A
amdS
PmeI (7832)
B-lactamase
pSaMe-F1
10242 pb

Fig. 11

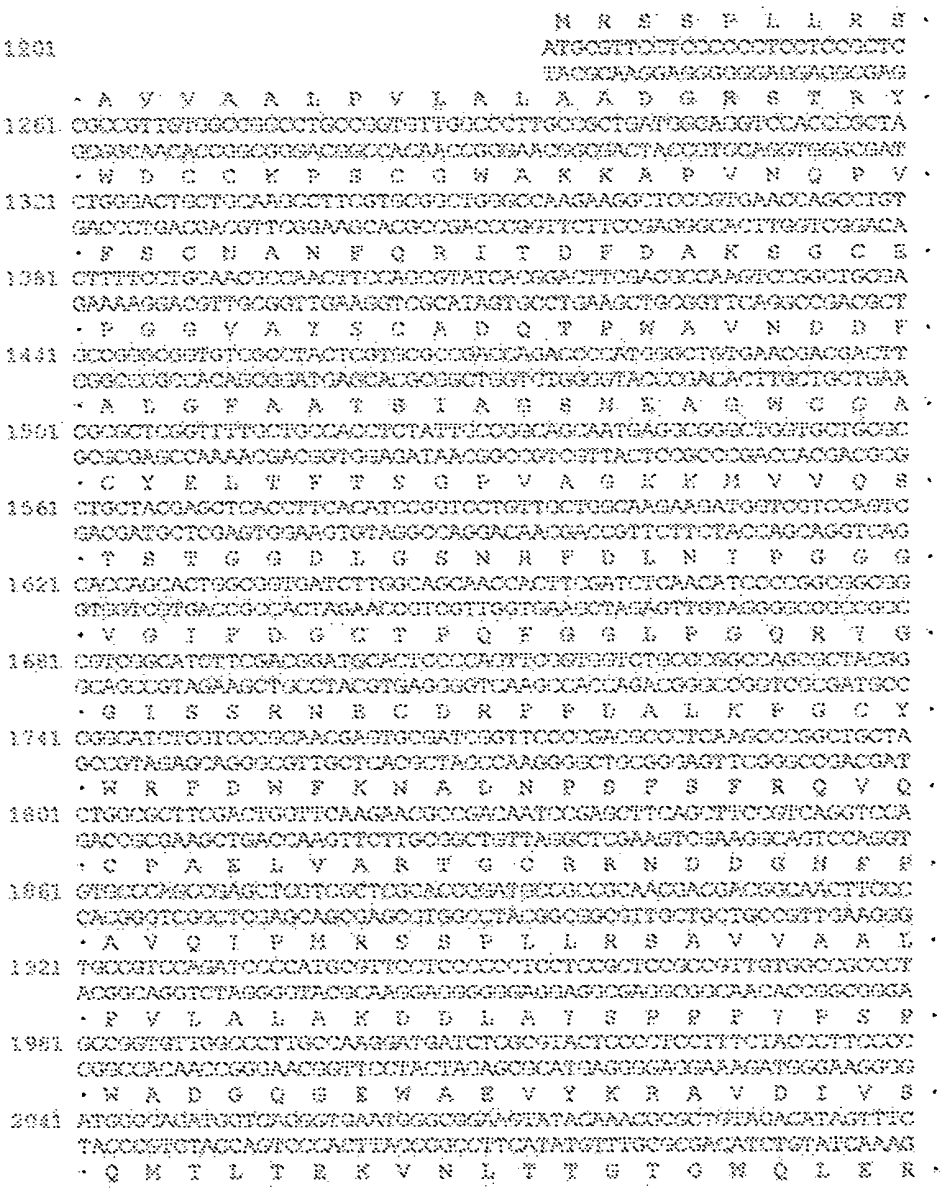


Fig. 12A

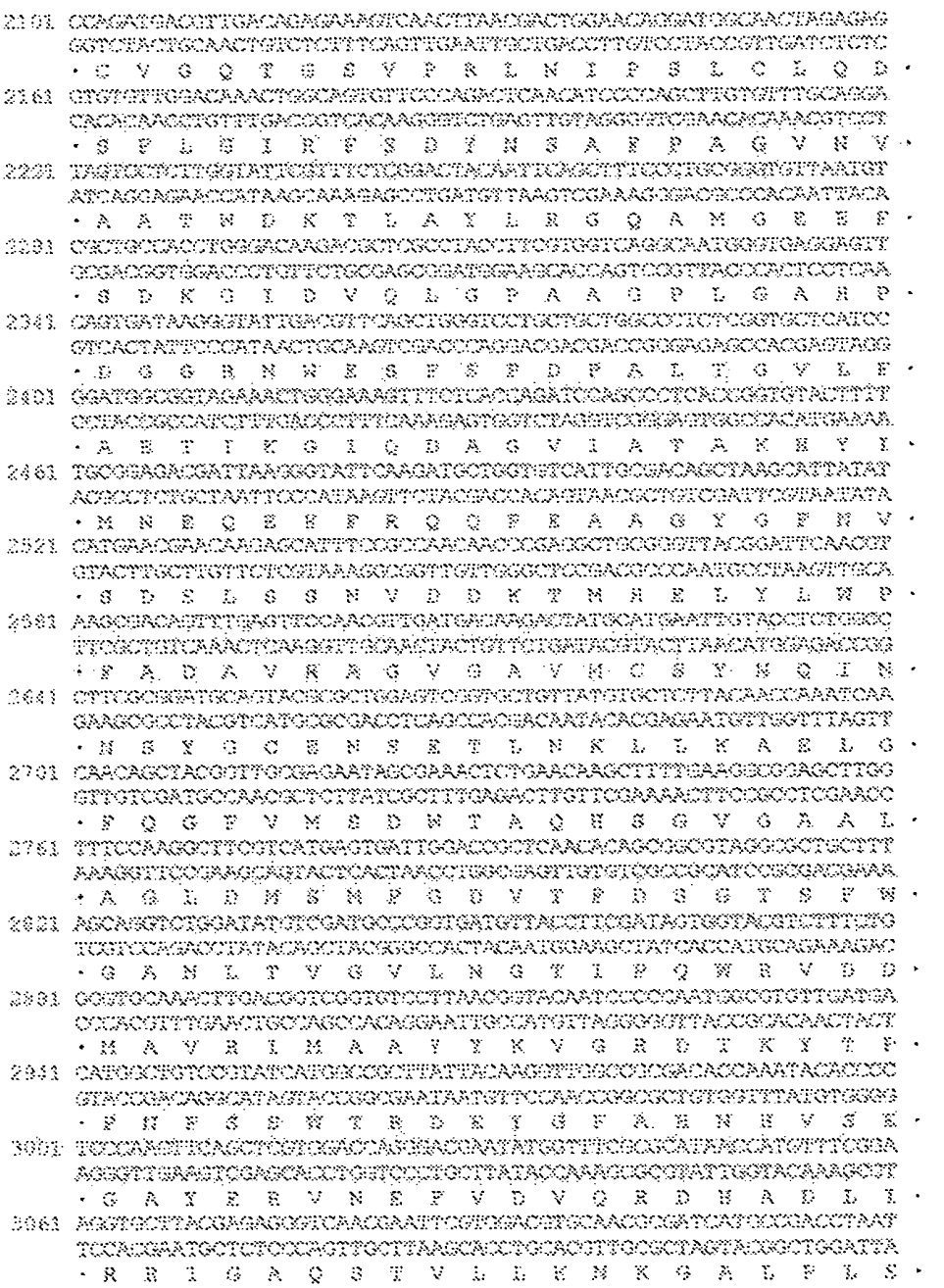


Fig. 12B

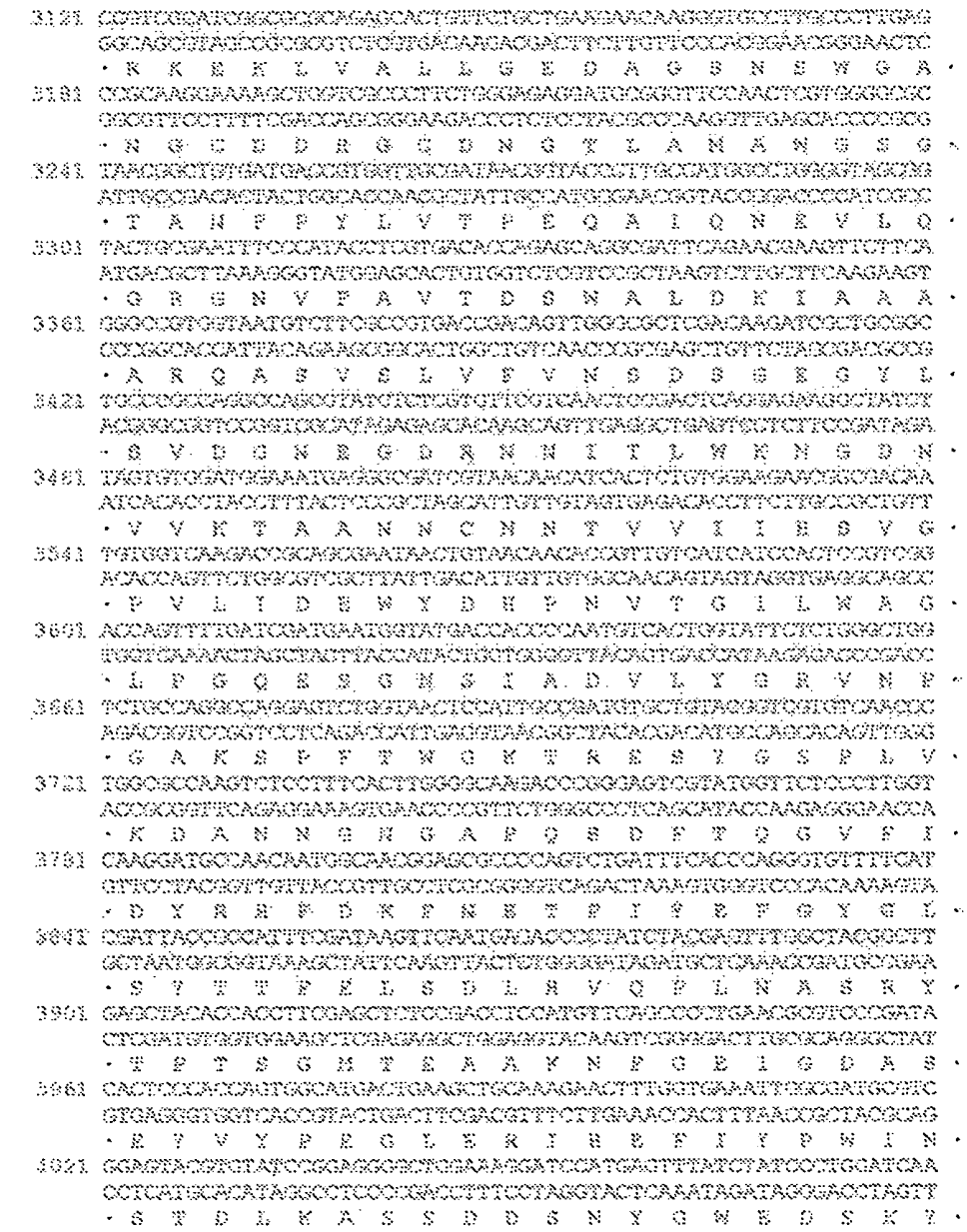


Fig. 12C

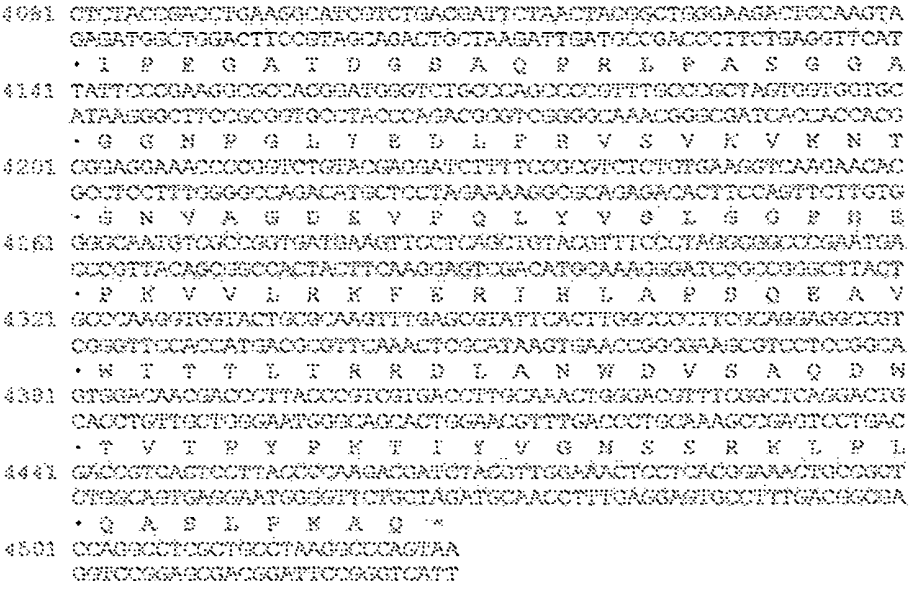


Fig. 12D

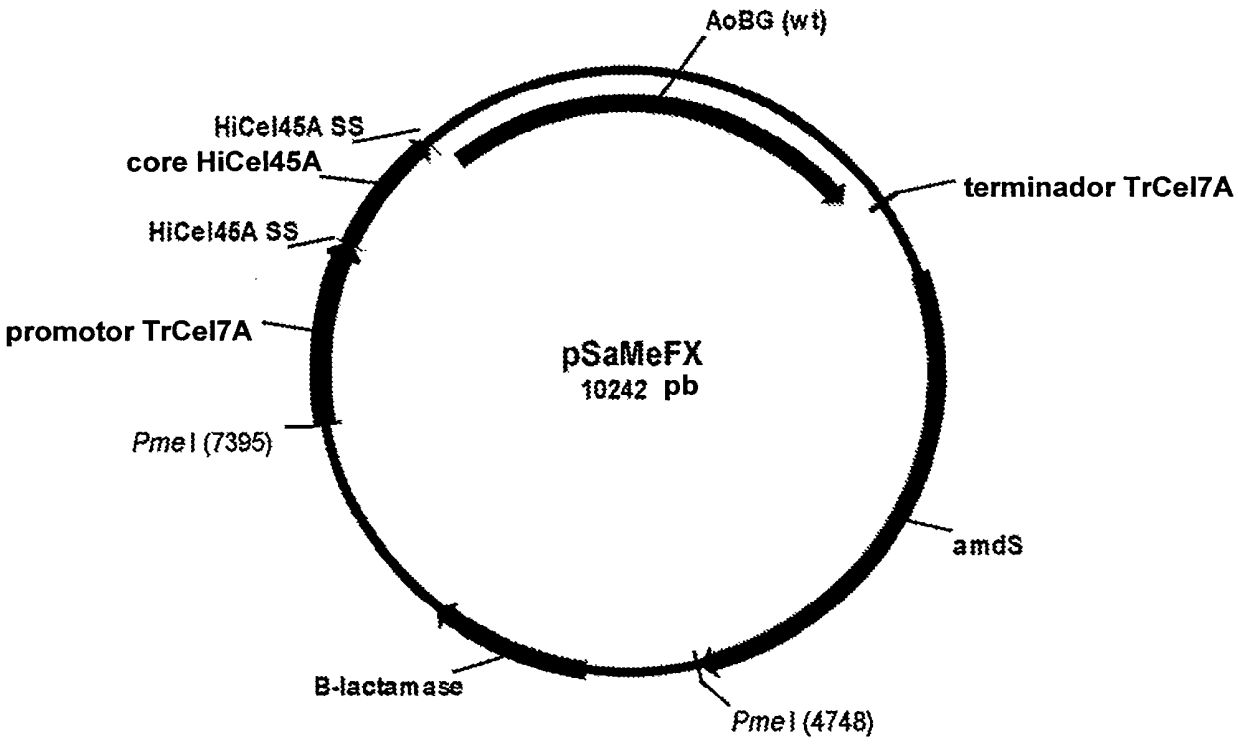

AoBG (wt)
HiCel45A SS
core HiCel45A
terminador TrCel7A
HiCel45A SS
promotor TrCel7A
pSaMeFX
10242 pb
PmeI (7395)
amdS
B-lactamase
PmeI (4748)

Fig. 13

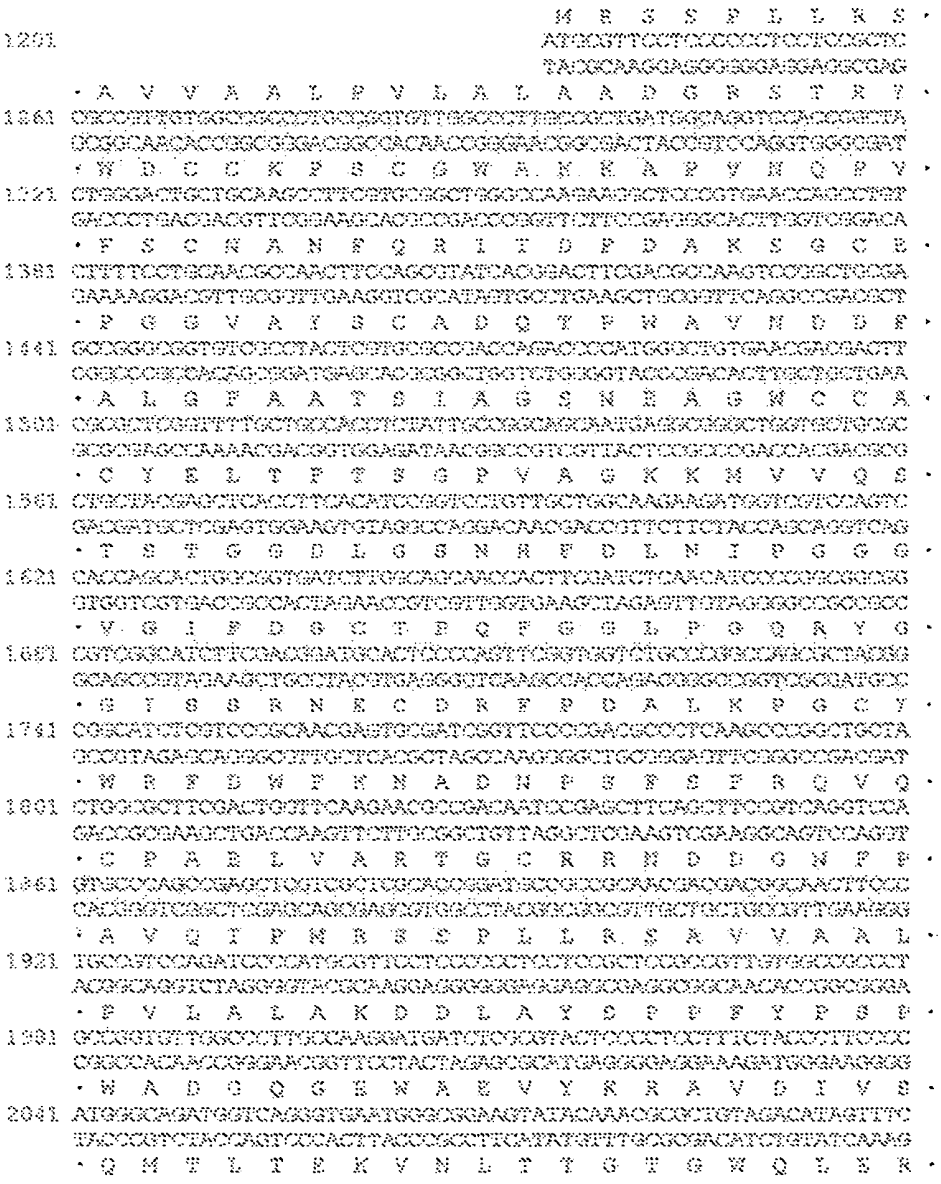


Fig. 14A

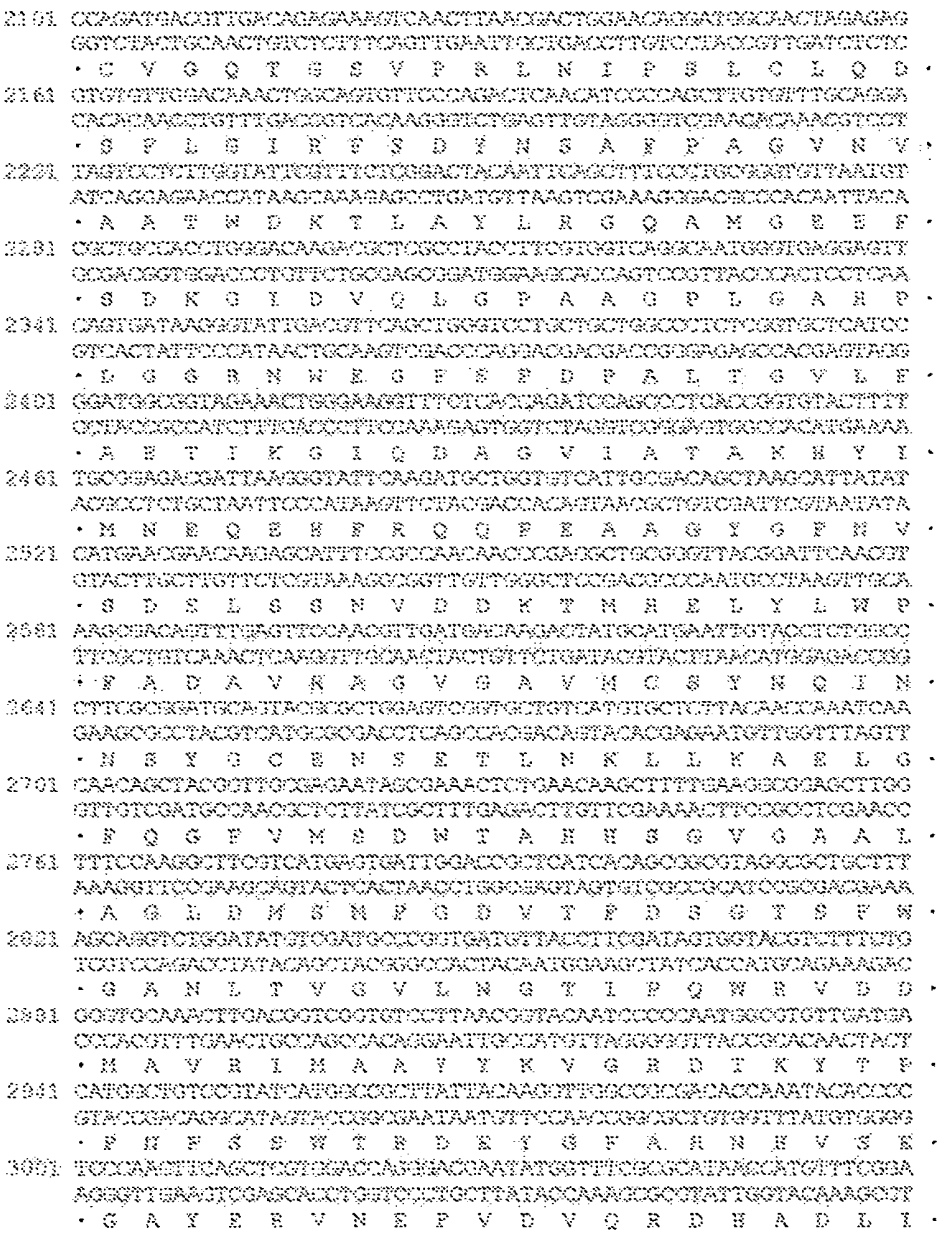


Fig. 14B

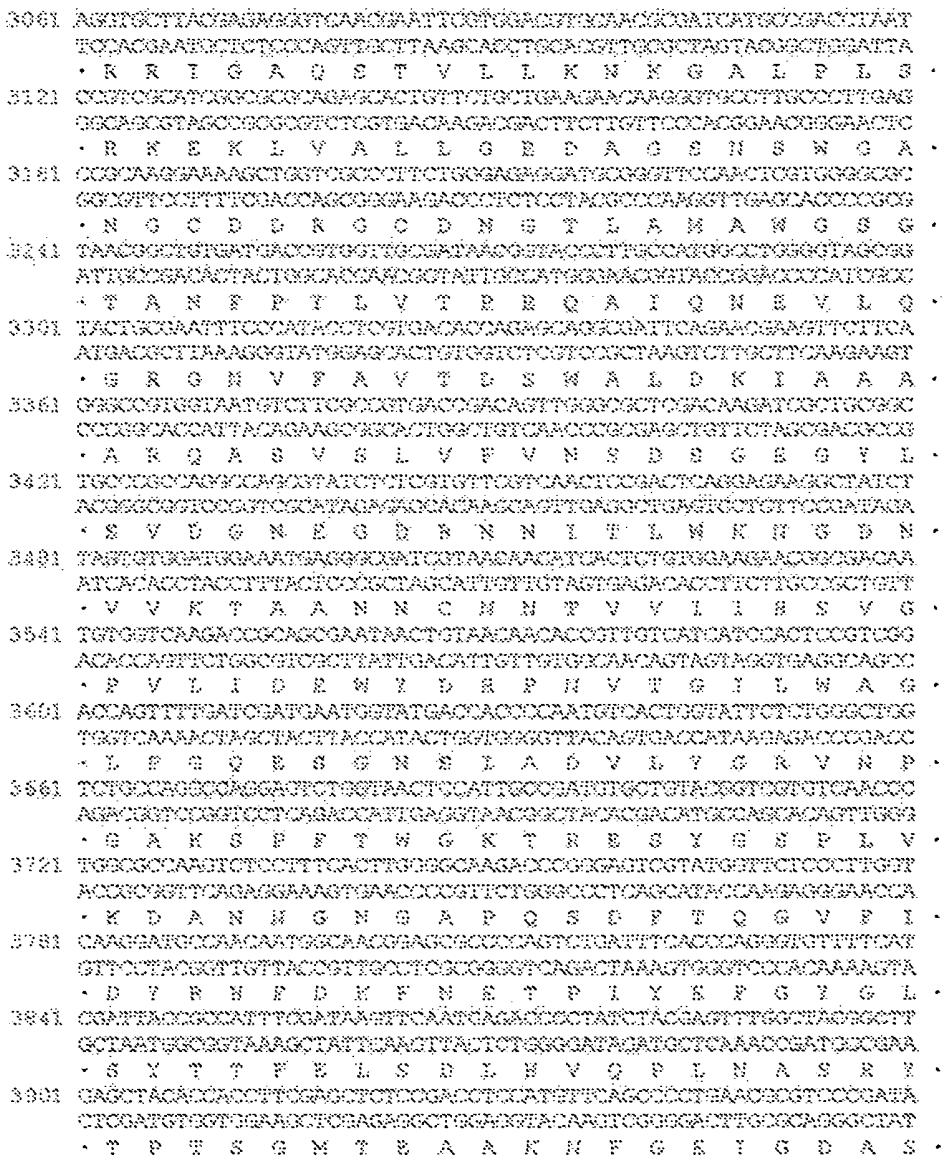


Fig. 14C



Fig. 14D

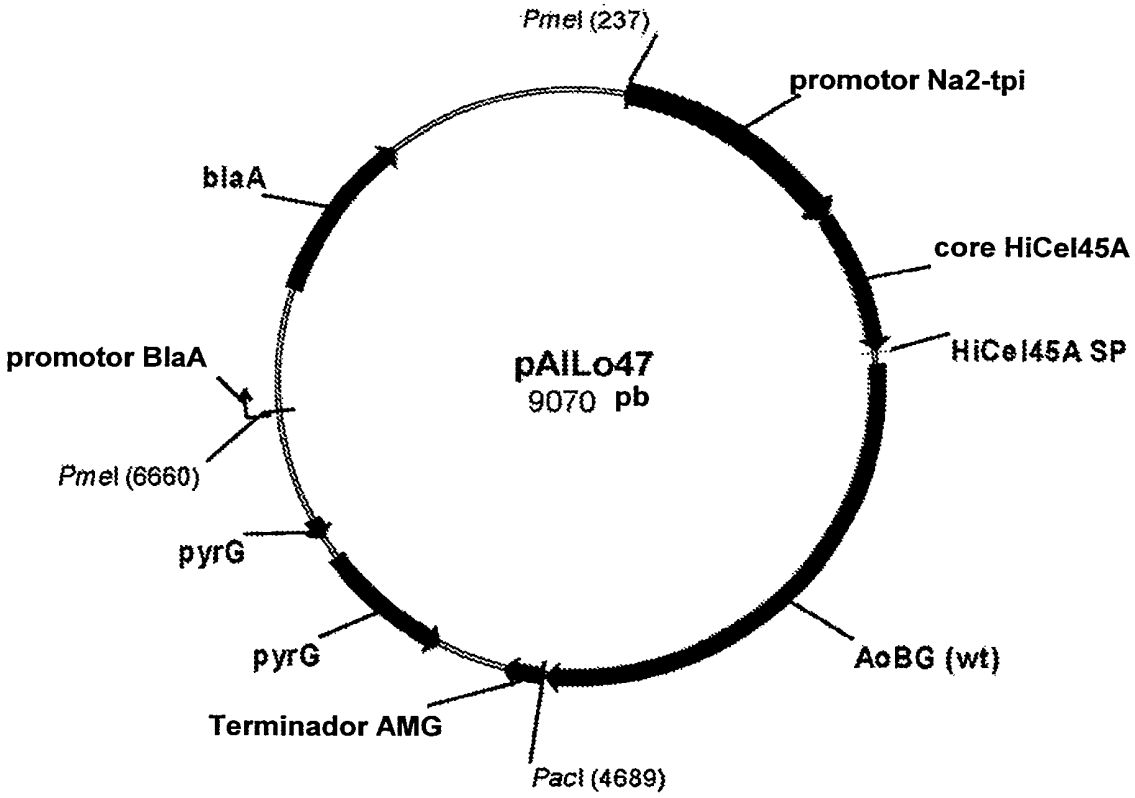

PmeI (237)
promotor Na2-tpi
core HiCel45A
HiCel45A SP
AoBG (wt)
PacI (4689)
Terminador AMG
pyrG
pyrG
PmeI (6660)
promotor BlaA
blaA
pAILo47
9070 pb

Fig. 15

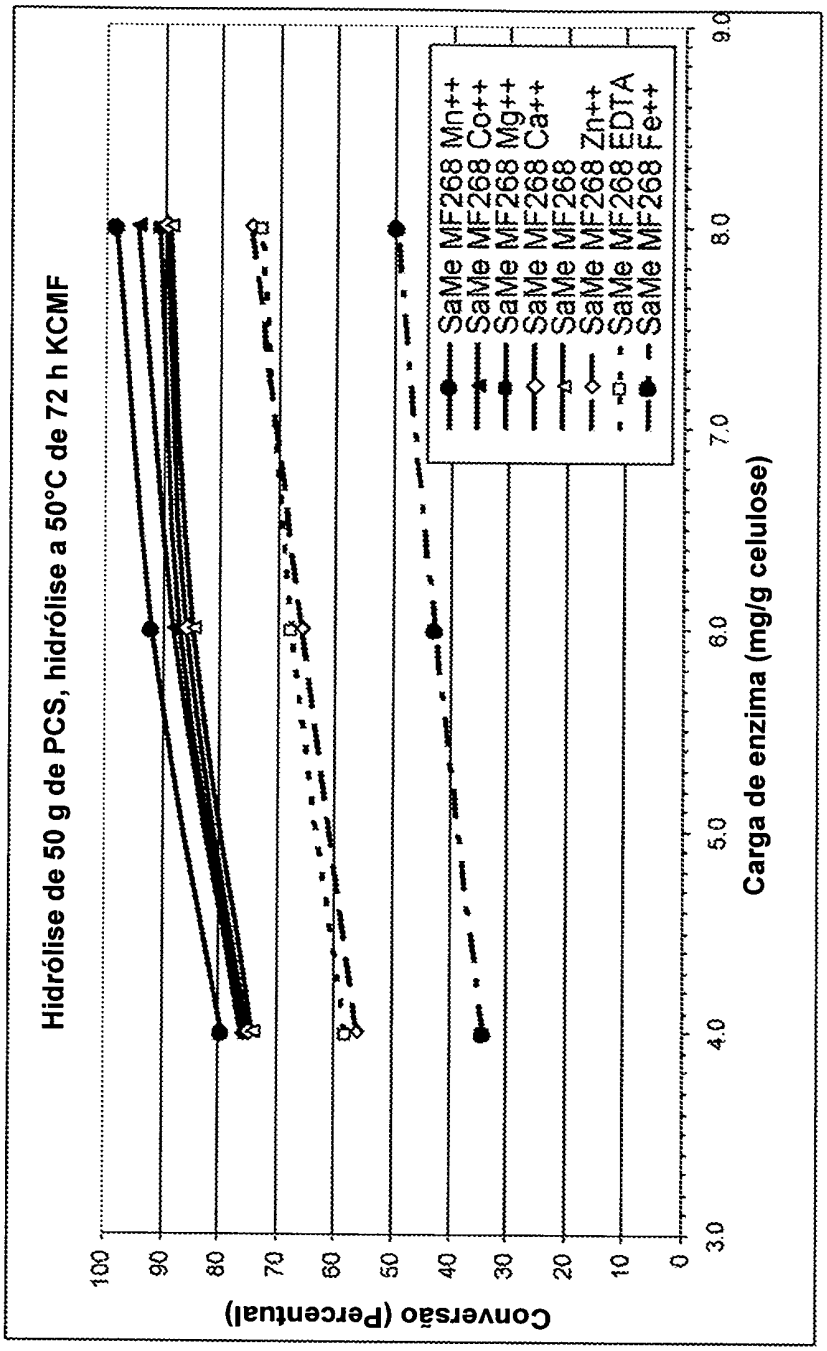

Hidrólise de 50 g de PCS, hidrólise a 50°C de 72 h KCMF
Conversão (Percentual)
Carga de enzima (mg/g celulose)
SaMe MF268 Mn++
SaMe MF268 Co++
SaMe MF268 Mg++
SaMe MF268 Ca++
SaMe MF268
SaMe MF268 Zn++
SaMe MF268 EDTA
SaMe MF268 Fe++

Fig. 16

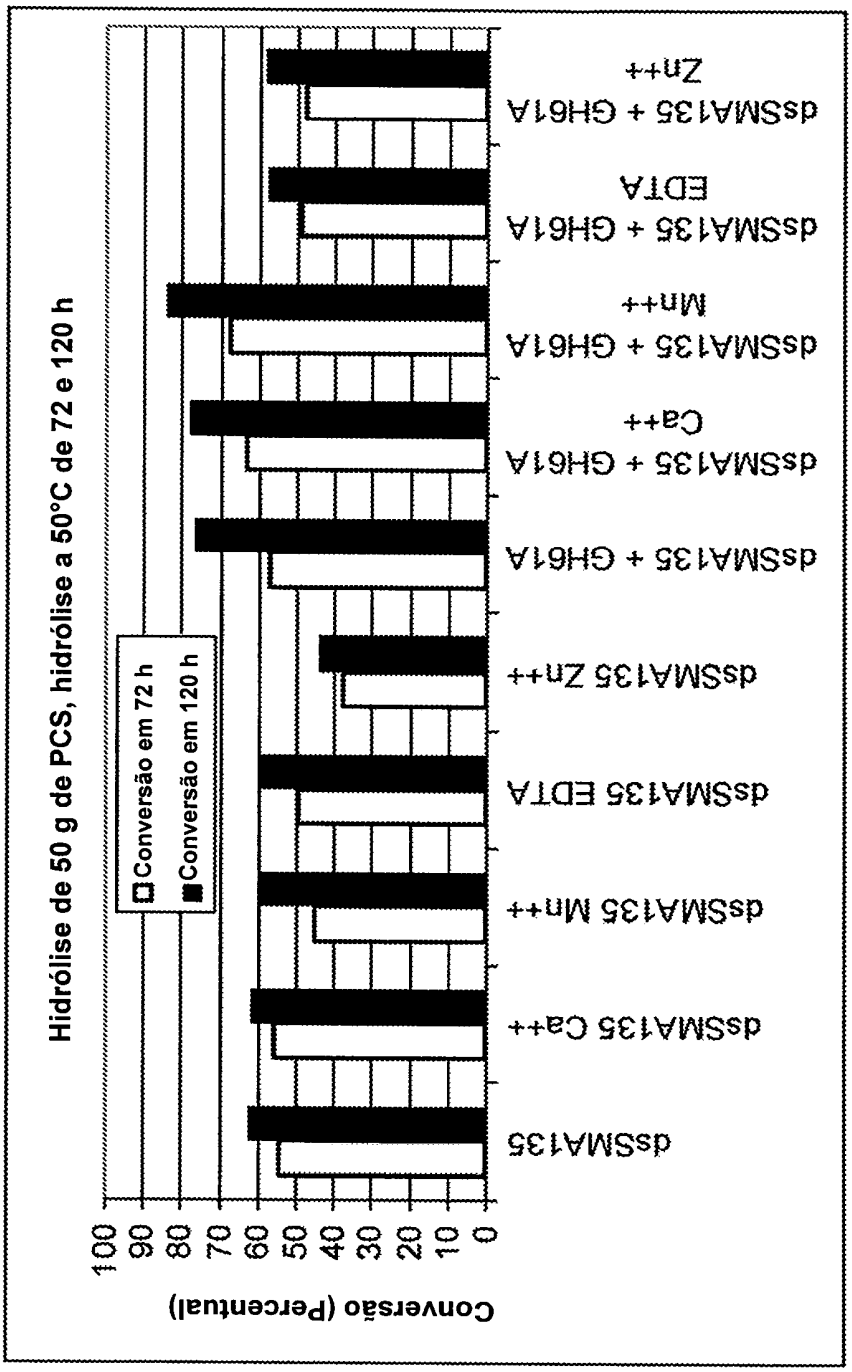

Hidrólise de 50 g de PCS, hidrólise a 50°C de 72 e 120 h
Conversão em 72 h
Conversão em 120 h
Conversão (Percentual)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
dsSMA135
dsSMA135 Ca++
dsSMA135 Mn++
dsSMA135 EDTA
dsSMA135 Zn++
dsSMA135 + GH61A
dsSMA135 + GH61A Ca++
dsSMA135 + GH61A Mn++
dsSMA135 + GH61A EDTA
dsSMA135 + GH61A Zn++

Fig. 17

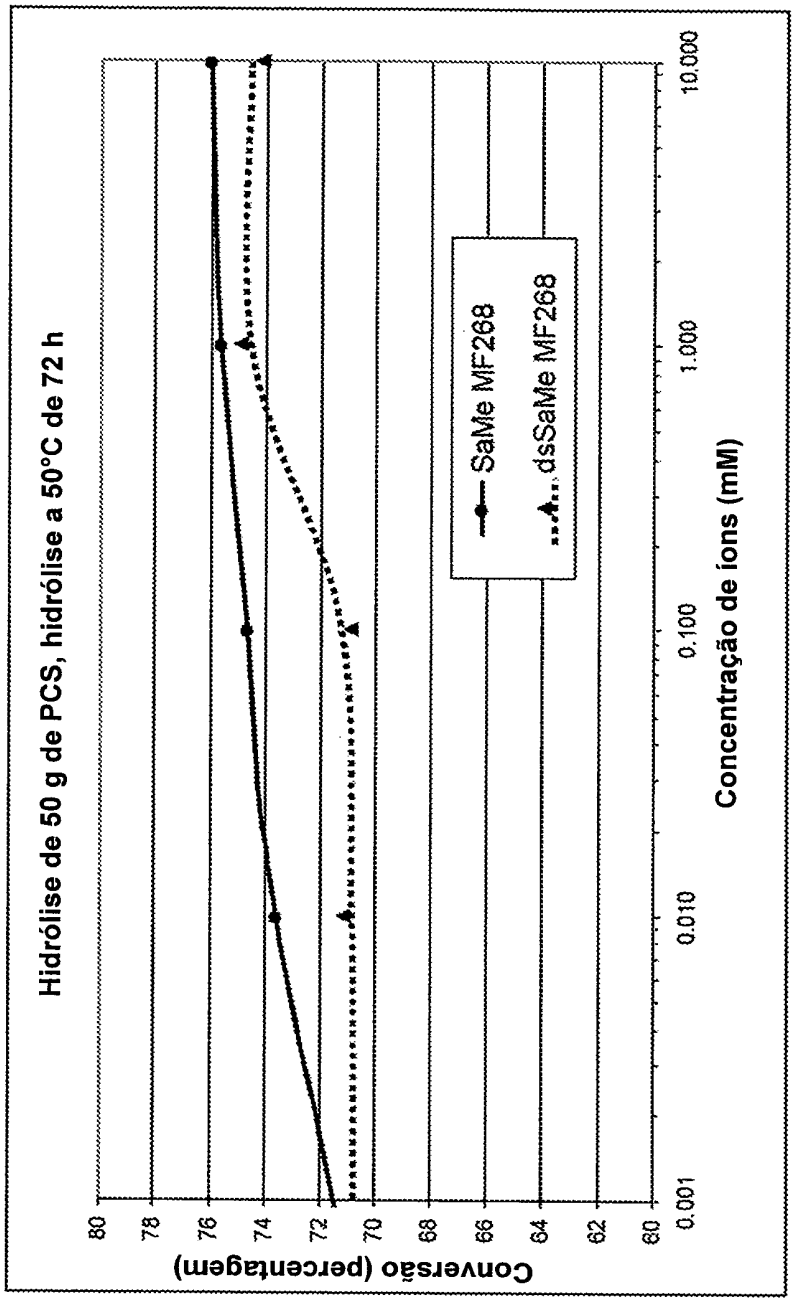

Hidrólise de 50 g de PCS, hidrólise a 50°C de 72 h
Conversão (percentagem)
80
78
76
74
72
70
68
66
64
62
60
0.001
0.010
0.100
1.000
10.000
Concentração de íons (mM)
SaMe MF268
dsSaMe MF268

Fig. 18