



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

(21) **PI0620287-0 A2**

(22) Data de Depósito: 15/12/2006  
(43) Data da Publicação: 08/11/2011  
(RPI 2131)



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

(54) **Título:** MÉTODO PARA TRATAR MATERIAL CELULÓSICO, USO DO MESMO, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, USO DA MESMA, POLIPEPTÍDEO, USO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO MESMO

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

(73) **Titular(es):** Roal Oy

(72) **Inventor(es):** Jari Vehmaanperä, Jarno Kallio, Liisa Viikari,  
Marika Alapuranen, Matti Siika-Aho, Sanni Voutilainen, Satu Hooman,  
Teemu Halonen, Terhi Puranen

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

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

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

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

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA TRATAR MATERIAL CELULÓSICO, USO DO MESMO, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, USO DA MESMA, POLIPEPTÍDEO, USO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO MESMO**".

**5 Campo da Invenção**

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

**Antecedentes da Invenção**

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

As fontes limitadas de combustíveis fósseis e as crescentes quantidades de CO<sub>2</sub> liberadas dos mesmos e que causam o fenômeno de estufa vêm elevando a necessidade do emprego de biomassa como uma

fonte de energia limpa e renovável. Uma tecnologia alternativa e promissora é a produção de biocombustíveis, isto é, etanol, de materiais celulósicos. No setor de transporte, os biocombustíveis estão sendo a única opção, que poderia reduzir as emissões de CO<sub>2</sub> em uma ordem de grandeza. O etanol pode ser empregado nos veículos e sistemas de distribuição existentes e assim não requer investimentos de infra-estrutura caros. Os açúcares derivados de matérias-primas lignocelulósicas renováveis podem também ser usados como matérias-primas para uma variedade de produtos químicos que podem substituir as substâncias químicas à base de petróleo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Existem inúmeras publicações revelando várias celulases e hemicelulases.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Breve Descrição da Invenção**

5 Foi verificado surpreendentemente que as enzimas celulósicas e especialmente as celobioidrolases obtidas de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum* são especificamente úteis na hidrólise de material celulósico. Além das celobioidrolases, esses fungos possuem endoglicanases, beta-glicosidades e xilanases que são muito apropriadas para degradação de material celulósico. As enzimas são  
10 cineticamente muito eficazes sobre uma ampla faixa de temperaturas e embora elas tenham atividade muito alta em temperaturas altas, elas também são muito eficientes em temperaturas de hidrólise padrão. Isso as torna extremamente bem apropriadas aos vários processos de hidrólise de substrato celulósico realizados em temperaturas convencionais e temperaturas elevadas.  
15

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

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

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

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

a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoá-

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

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

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

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

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

15 b) um filamento complementar de a)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 Concretizações específicas da invenção são estabelecidas nas reivindicações dependentes.

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

### Breve Descrição dos Desenhos

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

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

*thermophilum* ALKO4265.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Descrição Detalhada da Invenção

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

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

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

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

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

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

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

empregado aqui incluem celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosidase.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

| Beta-glicosidase | Gene            | Obtida de              | Ácido nucléico, SEQ ID Nº: | Aminoácido, SEQ ID Nº: |
|------------------|-----------------|------------------------|----------------------------|------------------------|
| Ta BG_81         | Ta <i>ce/3A</i> | <i>T. aurantiacus</i>  | 21                         | 22                     |
| At BG_101        | At <i>ce/3A</i> | <i>A. thermophilum</i> | 23                         | 24                     |
| Ct BG_76         | Ct <i>ce/3A</i> | <i>C. thermophilum</i> | 25                         | 26                     |

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

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

O termo "identidade" significa a identidade global entre duas sequências de aminoácido comparadas uma com a outra a partir do primeiro aminoácido codificado pelo gene correspondente até o último aminoácido. A identidade das sequências de comprimento pleno é medida por emprego do programa de alinhamento global Needleman-Wunsch da EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice e outros, 2000) pacote de programas, versão 3.0.0, com os seguintes parâmetros: EMBL0SUM62, penalidade de intervalo 10.0, penalidade estendida 0,5. O algoritmo é descrito em Needleman and Wunsch (1970). O versado na técnica está ciente do fato de que, quando se utiliza o algoritmo Needleman-Wunsch, os resultados são comparáveis apenas quando do alinhamento dos domínios correspondentes da sequência. Conseqüentemente, a comparação, por exemplo, de sequên-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O termo "preparação de enzima" refere-se a uma composição  
10 compreendendo pelo menos uma das enzimas desejadas. A preparação po-  
de conter as enzimas na forma parcialmente purificada e isolada. Ela pode  
consistir essencialmente em uma enzima ou enzimas desejadas. Alternati-  
vamente, a preparação pode ser um meio de cultura gasto ou filtrado con-  
tendo uma ou mais enzimas celulósicas. Além da atividade celulósica, a pre-  
15 paração pode conter aditivos, tais como, mediadores, estabilizadores, tam-  
pões, conservantes, agentes tensoativos e/ou componentes de meio de cul-  
tura. Os aditivos preferidos são aqueles que são geralmente usados nas  
preparações de enzima destinadas a uma aplicação específica. A prepara-  
ção da enzima pode ser na forma de líquido, pó ou granulado. Preferivel-  
20 mente, a preparação da enzima é o meio de cultura gasto. "Meio de cultura  
gasto" refere-se ao meio de cultura do hospedeiro compreendendo as enzi-  
mas produzidas. Preferivelmente, as células hospedeiras são separadas do  
meio após a produção.

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

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

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

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

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

Vários polipeptídeos celulósicos foram encontrados em *Thermascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum*, e *Chaetomium thermophilum*. Os novos polipeptídeos podem compreender um fragmento possuindo atividade celulósica e serem selecionados do grupo consistindo em um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 66%, preferivelmente 70% ou 75% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 4, 79% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 6, 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 12, 68%, preferivelmente 70% ou 75% de identidade em relação à SEQ ID Nº: 14, 72%, preferivelmente 75% de identidade em relação à SEQ ID Nº: 16, 68%, preferivelmente 70% ou 75% de identidade em relação à SEQ ID Nº: 20, 74% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 22 ou 24, ou 78% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 26.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Exemplos**

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

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

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

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

- 5 Celulose Solka Floe 18, grão 18 gasto do destilador, xilana 9 de aveia e espelta,  $\text{CaCO}_3$  2, carne de soja 4,5,  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$  4,5, farelo de trigo 3,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,5, NaCl 0,5,  $\text{KNO}_3$  0,9, goma de alfarroba 9,0, solução de elemento de traço #1 0,5, solução de elemento de traço #2 0,5 e Struktol (Stow, OH, USA) antiespumante 0,5 mL; o pH foi ajustado para 6,5.
- 10 Solução de elemento de traço #1 possui g/litro:  $\text{MnSO}_4$  1,6,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3,45 e  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,0; solução de elemento de traço #2 possui g/litro:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,0 com duas gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

- A cepa ALKO4261 foi cultivada em frascos de agitação no meio 1 x B, que possui um terço de cada um dos constituintes do meio 3 x B (acima, exceto que possui as mesmas concentrações de  $\text{CaCO}_3$ , NaCl e os elementos de traço. A cepa foi cultivada a 45°C por 7 dias.

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

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

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

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

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

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

A atividade da endoglicanase (CMCase):

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

Atividade da beta-glicosidase (BGU):

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

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

- 30                   Para purificações da proteína, a ALKO4242 também se desenvolveu em um bioreator de 2 litros (Braun Biostat<sup>(R)</sup> B, Braun, Melsungen, Alemanha) no meio que se segue, g/litro: celulose Solka Floc 40, carne de soja 10, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,05, solução

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

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

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

Para purificação da enzima, ALKO4265 também se desenvolveu em um bioreator de 10 litros (Braun Biostat<sup>(R)</sup> ED, Braun, Melsungen, Alemanha) no mesmo meio como acima, exceto que  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi adicionado a

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

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

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

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

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

A atividade específica das preparações foi determinada empre-

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

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

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

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

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

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

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

O sobrenadante de cultura concentrado foi aplicado a uma coluna de interação hidrófoba HiPrep 16/10 Butyl FF, equilibrada com 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . As proteínas ligadas foram eluídas com o gradiente linear a partir do tampão acima para 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Exemplo 7. Purificação de uma $\beta$ -glicosidase a partir de *Chaetomium thermophilum* ALKO4261**

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

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

Após dessalinização, a amostra foi aplicada a uma coluna de

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

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

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

## 20 **Exemplo 8. Purificação e caracterização de uma $\beta$ -glicosidase a partir de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242**

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

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

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

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

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

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

                  A estabilidade térmica da  $\beta$ -glicosidase purificada foi determina-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O sobrenadante da cultura foi aplicado a uma coluna de interação hidrófoba HiPrep 16/10 Phenyl Sepharose FF equilibrada com 20 mM de tampão de fosfato de potássio pH 6,0, contendo 0,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . As proteínas ligadas foram eluídas com um protocolo de eluição de duas etapas. A eluição foi realizada por queda da concentração de sal primeiro a 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e após isso, foi fornecido um gradiente linear de 20 mM de fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 5 mM de fosfato de potássio, pH 6,0. A proteína foi eluída com 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $I = 39 \text{ mS/cm}$ ).

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

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

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

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

#### **Exemplo 11. Seqüenciamento interno do aminoácido**

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

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

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

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

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

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

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

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

| Proteína | Peptídeo   | Seqüência <sup>(a)</sup>          |
|----------|------------|-----------------------------------|
| At EG_40 | Peptídeo 1 | Q S C S S F P A P L K P G C Q W R |
|          | Peptídeo 2 | Y A L T F N S G P V A G K         |
|          | Peptídeo 3 | V Q C P S E L T S R               |
|          | Peptídeo 4 | N Q P V F S C S A D W Q R         |
|          | Peptídeo 5 | Y W D C C K P S C G W P G K       |

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

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

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

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

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

| Proteína | Peptídeo   | Seqüência <sup>(a)</sup>      |
|----------|------------|-------------------------------|
|          | Peptídeo 5 | M W L C E N D R               |
|          | Peptídeo 6 | Y P Q L C L Q D G P L G I R   |
|          | Peptídeo 7 | E L N G Q N S G Y P S I       |
| Ta BG_81 | Peptídeo 1 | T P F T W G K                 |
|          | Peptídeo 2 | L C L Q D S L P G V R         |
|          | Peptídeo 3 | G V D V Q L G P V A G V A P R |
|          | Peptídeo 4 | V N L T L E                   |
|          | Peptídeo 5 | F T G V F G E D V V G         |
|          | Peptídeo 6 | N D L P L T G Y E K           |

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

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

5 *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

| Proteína     | Peptídeo   | Seqüência                                                |
|--------------|------------|----------------------------------------------------------|
| At<br>XYN_60 | Peptídeo 1 | Y N D Y N L E Y N Q K                                    |
|              | Peptídeo 2 | F G Q V T P E N                                          |
|              | Peptídeo 3 | V D G D A T Y M S Y V N N K                              |
|              | Peptídeo 4 | K P A W T S V S S V L A A K                              |
|              | Peptídeo 5 | S Q G D I V P R A K                                      |
| Ta<br>XYN_30 | Peptídeo 1 | V Y F G V A T D O N R                                    |
|              | Peptídeo 2 | N A A I I Q A D F G Q V T P E N S M K                    |
|              | Peptídeo 3 | G H T L V W H S Q L P S W V S S I T D K                  |
|              | Peptídeo 4 | N H I T T L M T R                                        |
|              | Peptídeo 5 | A W D V V N E A F N E D G S L R                          |
|              | Peptídeo 6 | L Y I N D Y N L D S A S Y P K                            |
|              | Peptídeo 7 | A S T T P L L F D G N F N P K P A Y N A<br>I V Q D L Q Q |
|              | Peptídeo 8 | Q T V F L N V I G E D Y I P I A F Q T A<br>R             |

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

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

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

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

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

Métodos de biologia molecular padrão foram empregados no

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

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

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

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

| Gene          | Iniciador à frente                      | Iniciador reverso                      | DNA do gabarito                       | Fragmento (kb) | Plasmídeo |
|---------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------|-----------|
| <i>Ta cbh</i> | <b>TCEL11</b><br>atnccaactgacatttgcctcc | <b>TCEL12</b><br>gaatttggagctagtgtgacg | <i>Thermoascus</i><br><b>ALKO4242</b> | 0,8 kb         | pALK1633  |
| <i>CT cbh</i> | <b>TCEL7</b><br>cgatgccaaactggcgctggac  | <b>TCEL8</b><br>ttcttgatgatatcaacatc   | <i>Chaetomium</i><br><b>ALKO4265</b>  | 0,8 kb         | pALK1632  |
| <i>At chb</i> | <b>TCEL13</b><br>agctcgaccaactgctacacg  | <b>TCEL4</b><br>accgtgaactcttctgctgtg  | <i>Acremonium</i><br><b>ALKO4245</b>  | 0,7 kb         | pALK1634  |

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

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

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

No total, quatro genes *cbhlcel7* foram clonados; um de *Thermascus aurantiacus* ALKO4242, um de *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e dois de *Acremonium thermophilum* ALKO4245 (na fase anterior do trabalho, essas tinham os códigos At-cbh-C e At-cbh-A, e foram então denominadas como At *cel7A* e At *cel7B*, respectivamente). A tabela 7 resume as informações com relação às sondas usadas para classificação dos genes, os clones de fago dos quais os genes foram isolados, os fragmentos de restrição escolhidos contendo os genes de comprimento pleno com suas regiões promotora e terminadora, as denominações dos plasmídeos e os números de depósito para as cepas de *E.coli* transportando esses plasmídeos.

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

| Gene                   | Sonda usada na classificação | Clone do fago | Fragmento subclonado em pBluescript II | Número do plasmídeo | Número do depósito de <i>E.coli</i> |
|------------------------|------------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| <b>Ta <i>cel7A</i></b> | pALK1633                     | F12           | 3,2 kb <i>XbaI</i>                     | pALK1635            | DSM 16723                           |
| <b>Ct <i>cel7A</i></b> | pALK1632                     | F36           | 2,3 kb <i>PvuI</i> – <i>HindIII</i>    | pALK1642            | DSM 16727                           |
| <b>At <i>cel7B</i></b> | pALK1634                     | F6            | 3,1 kb <i>EcoRI</i>                    | pALK1646            | DSM 16728                           |
| <b>At <i>cel7A</i></b> | pALK1634                     | F2            | 3,4 kb <i>XhoI</i>                     | pALK1861            | DSM 16729                           |

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

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

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

**Tabela 8.** Resúmo dos genes *cbh/cel7* isolados de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242, *Chaetomium thermophilum* ALKO4265 e *Acremonium thermophilum* ALKO4245.

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

(a O códon STOP foi incluído.

(b O códon STOP não foi incluído.

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

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

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

modelos Markov impedidos.

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

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

(d O número de seqüências N-X-S/T.

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

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

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

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

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

| Organismo, enzima e número de acesso                 | Identidade (%) |
|------------------------------------------------------|----------------|
| <b>* <i>Thermoascus aurantiacus</i> Cel7A</b>        | 100,0          |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> , AY840982            | 99,6           |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> , AX657575            | 99,1           |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> , AF421954            | 97,8           |
| <i>Talaromyces emersonii</i> , AY081766              | 79,5           |
| <i>Chaetomidium pingtungium</i> , AX657623           | 76,4           |
| <i>Trichophaea saccata</i> , AX657607                | 73,4           |
| <b>* <i>Acremonium thermophilum</i> Cel7A (core)</b> | 70,6           |
| <i>Emericella nidulans</i> , AF420020 (core)         | 70,4           |
| <b>* <i>Chaetomium thermophilum</i> Cel7A (core)</b> | 66,4           |

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

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

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

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

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

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

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

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

A produção de CBH/Cel7 dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura dos cultivos do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes se desenvolveram por 7 dias a 28°C em um meio de indução de celulose à base de lactose complexo (Joutsjoki e outros, 1993) tamponado com 5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. A atividade da celobioidrolase foi ensaiada empregando substrato de 4-metilumbeliferil-β-D-lactosídeo (MUL) de acordo com van Tilbeurgh e outros, 1988. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados por emprego de Southern blots onde várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A expressão heteróloga das proteínas Ta Cel7A, Ct Cel7A, At Cel7A e At Cel7B foi analisada por SDS-PAGE com coloração Coomassive subsequente. A verificação de que nenhuma atividade de celobioidrolase ou produção de proteína heteróloga em SDS-PAGE seria detectada pelos transformantes de At Cel7B contendo cassete de expressão integrado, sugere que At Cel7B é produzida abaixo dos níveis de detecção no *Trichoderma* usando o projeto experimental descrito.

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

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

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

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

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

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

- 20 5'-TTAAACATATGTTATCTACTCCAACATCAAGGTCGGACCCATCGGCTCGACCGTCCCTGGCCTTGAC-3'  
(sequência a frente) e

5'-TATATGCGGCCGCAAGCTTTACCATCAAGTTACTCCAGCAAATCAGGGAAGT-3'  
(sequência reversa).

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

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

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

A produção de Cel7+CBD de *Thermoascus aurantiacus* (SEQ ID N°: 28 e 30) dos transformantes foi analisada a partir dos sobrenadantes de cultura dos cultivos do frasco de agitação (50 mL). Os transformantes se desenvolveram por 7 dias em um meio de indução de celulose à base de lactose complexo (Joutsjoki e outros, 1993) tamponado com 5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e pH 5,5. A atividade da celobioidrolase foi ensaiada empregando substrato de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-lactosídeo (MUL) de acordo com van Tilbeurgh e outros, 1988. Os genótipos dos transformantes escolhidos foram confirmados por emprego de Southern blots onde várias digestões genômicas foram incluídas e o respectivo cassete de expressão foi usado como uma sonda. A análise SDS-PAGE mostrou que as enzimas Cel7A+CBD de *Thermoascus aurantiacus* recombinante foram produzidas como proteínas de fusão estáveis em *T.reesei*.

O transformante escolhido produzindo a proteína de fusão Ta Cel7A+Tr CBD (SEQ ID N°: 28) foi também cultivado em bioreator de 2 litros

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

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

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

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

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

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

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

| Enzima   | $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) | Tipo de inibição |
|----------|-------------------------|------------------|
| Ct Cel7A | 39                      | competitiva      |
| Ta Cel7A | 107                     | competitiva      |
| At Cel7A | 141                     | competitiva      |
| Tr Cel7A | 19                      | competitiva      |

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

| Proteína | Peptídeo               | Localização do iniciador | Seqüência do iniciador <sup>(b)</sup>    |
|----------|------------------------|--------------------------|------------------------------------------|
| At EG_40 | Peptídeo 5             | 1-6                      | TAYTGGGAYTGYTGAAARCC                     |
|          | WFQNADN <sup>(c)</sup> |                          | RTTRTCNGCRTTTYTGRAACCA                   |
| Ct EG_54 | Peptídeo 7             | 3-7                      | GCAAGCTTCGRCARAARTCRTCRTT <sup>(d)</sup> |
|          | Peptídeo 2             | 5-9                      | GGAATTTCGAYCARACNGARCARTA <sup>(e)</sup> |

<sup>(a)</sup> Aminoácidos do peptídeo usado para designação da seqüência do iniciador

<sup>(b)</sup> N = A, C, G, ou T; R = A ou G; Y = C ou T

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

<sup>(d)</sup> Um sítio de restrição *Hind*III foi adicionado à extremidade 5' do oligonucleotídeo

<sup>(e)</sup> Um sítio de restrição *Eco*RI foi adicionado à extremidade 5' do oligonucleotídeo.

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

dores à frente (TAYTGGGAYTGYTGYAARCC) e reversos (RTTTRTCNG-CRTTYTGRAACCA) usando DNA genômico como um gabarito. As misturas de reação da PCR continham 50 mM de Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 µg de cada iniciador, 1 unidade de DNA polimerase Dynazyme (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 0,5 µg de DNA genômico de *Acremonium*. As condições para reações da PCR foram como se segue: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto de recombinação a 50-60°C, 2 minutos de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para ampliação do gene de *cel7B* de *Chaetomium thermophilum* (codificação para Ct EG-54) sonda específica, um iniciador à frente (GGAATTCGAYCARACNGARCARTA) e um iniciador reverso (GCA-AGCTTCGRCARAARTCRTCRTT) foram usados. As misturas de reação da PCR continham 10 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 250 pmol de cada iniciador, 2 unidades de DNA polimerase Dynazyme II (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 2 µg de DNA genômico de *Chaetomium*. As condições para reação da PCR eram conforme descrito acima, exceto que a recombinação foi realizada a 45-50°C.

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

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

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

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

| Gene            | Biblioteca genômica                | Sonda usada na classificação | Clone do fago | Fragmento subclonado   | Plasmídeo | Nº de depósito de <i>E.coli</i> |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------|---------------|------------------------|-----------|---------------------------------|
| At <i>cel5A</i> | <i>A. thermophilum</i><br>ALKO4245 | pALK1710                     | P24           | 5,5 kb <i>SmaI</i>     | pALK1908  | DSM<br>17324                    |
| At <i>cel5B</i> | <i>A. thermophilum</i><br>ALKO4245 | pALK1711                     | P41           | 6,0 kb <i>XhoI</i>     | pALK1904  | DSM<br>17323                    |
| Ct <i>cel7B</i> | <i>C. thermophilum</i><br>ALKO4261 | pALK2005                     | P55           | 5,1 kb<br><i>BamHI</i> | pALK2010  | DSM<br>17729                    |

O gene *cel5A* de *Thermoascus aurantiacus* (codificando para EG-28) (SEQ ID Nº:9) foi ampliado diretamente do DNA genômico isolado por reação da PCR. Os iniciadores à frente (ATTAACCGCGGACTGCGCATCATGAAGCTCGGCTCTCTCGTGCTC) e reverso (AACTGAGGCATAGAACTGACGTCATATT) que foram usados para ampliação foram designados com base no gene *eg1* de *T. aurantiacus* publicado (AF487830). As misturas da PCR continham tampão 1 x Phusion HF, 0,3 mM dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador, duas unidades de DNA polimerase Phusion® DNA (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 0,25 µg de DNA genômico de *Thermoascus*. As condições para reações da PCR foram como se segue: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos de recombinação a 57-67°C, 2 minutos e meio de extensão a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto ampliado de 1,3 kb contendo o gene exato (do códon START para STOP) foi clonado como um fragmento *SacII-PstI* no vetor p-Bluescript II KS+. Dois clones independentes foram seqüenciados e um clone foi selecionado e designado como pALK1926. O número de depósito da cepa *E.coli* contendo pALK1926 na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Culture Collection é DSM 17326.

Informações relevantes dos genes e seqüências de proteína de-

duzidas (SEQ ID Nº:9-16) são resumidas nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. As seqüências de peptídeo das endoglicanases purificadas de EG-40 de *Acremonium* (gene At cel45A), EG-54 de *Chaetomium* (gene Ct ce/7B) e EG-28 de *Thermoascus* (gene Ta ce/5A) foram encontradas nas seqüências de aminoácido deduzidas correspondentes dos genes clonados confirmando

5 que os genes apropriados foram clonados.

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

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

(a O códon STOP está incluído

10 (b O códon STOP não está incluído

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

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

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

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

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

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

<sup>(e)</sup> De acordo com Hong e outros, 2003a

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 19. Cassetes de expressão construídos para produção de endoglicanases de EG-40/Cel45A de *Acremonium thermophilum*, semelhante a EG-40/Cel45B e EG-28/Cel5A de *Thermoascus aurantiacus* no *Trichoderma reesei*. A estrutura esquemática dos cassetes de expressão é descrita na figura 2.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

| Proteína         | Peptídeo              | Localização do iniciador <sup>(a)</sup> | Seqüência do iniciador <sup>(b)</sup> |
|------------------|-----------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| At $\beta$ G_101 | EKVNLT <sup>(c)</sup> |                                         | GARAARGTNAAYCTNAC                     |
|                  | Peptídeo 4            | 6-11                                    | YTTRCCRTTTRTTSGGRGTRTA                |
| Ct $\beta$ G_76  | Peptídeo 6            | 4-9                                     | TNTGYCTNCARGAYGG                      |
|                  | Peptídeo 1            | 3-8                                     | TCRAARTGSCGRTARTCRATRAASAG            |
| Ta $\beta$ G_81  | Peptídeo 3            | 1-5                                     | AARGGYGTSGAYGTSCAR                    |
|                  | Peptídeo 1            | 2-7                                     | YTTRCCCCASGTRAASGG                    |

<sup>(a)</sup> Aminoácidos do peptídeo usados para designação da seqüência do iniciador

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

<sup>(c)</sup> Peptídeo não derivado da proteína purificada  $\beta$ G-101 de *Acremonium*, porém se origina da sequência de  $\beta$ -glicosidase *A. cellulolyticus* (BD168028)

5 homóloga à  $\beta$ G-101.

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

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

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

Biotechnology Information; Altschul e outros, 1990).

A inserção dos plasmídeos pALK1713, pALK1924 e pALK1935 foi isolada pela digestão da enzima de restrição e rotulada com digoxigenina de acordo com as instruções do fabricante (Roche, Alemanha). Cerca de 1-2 x 10<sup>5</sup> placas da biblioteca genômica ampliada de *Acremonium*, *Chaetomium* ou *Thermoascus* foram classificadas, conforme descrito no Exemplo 18. Várias placas positivas foram obtidas, das quais cinco a seis placas fortemente hibridizantes foram purificadas de cada classificação. Os DNAs de fago foram isolados e analisados por hibridização Southern blot. Os fragmentos de restrição hibridizando com relação à sonda foram subclonados no vetor p-Bluescript II KS+ (Stratagene, USA) e as partes revelantes foram sequenciadas. Em todos os casos, o fragmento de fago subclonado contém o gene de comprimento pleno de interesse. A tabela 21 resume as informações das sondas usadas para classificação dos genes de  $\beta$ -glicosidase, clones de fago dos quais os genes foram isolados, fragmentos de restrição escolhidos contendo os genes de comprimento pleno com suas regiões promotora e terminadora, nomes dos plasmídeos contendo o fragmento de fago subclonado e os números de depósito na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Culture Collection (DSM) para as cepas de *E.coli* transportando esses plasmídeos.

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

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

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

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

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

- 10 <sup>(a)</sup> O códon STOP está incluído

<sup>(b)</sup> O códon STOP não está incluído

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

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

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

<sup>(b)</sup> Presença de um domínio de ligação de celulose na proteína.

<sup>(c)</sup> A seqüência de sinal prevista não está incluída. A previsão foi feita usando

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

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

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

Tabela 24. Comparação das  $\beta$ -glicosidases deduzidas de  $\beta$ G-101/Cel3A de *Acremonium thermophilum*,  $\beta$ G-76/Cel3A de *Chaetomium thermophilum* e  $\beta$ G-81/Cel3A de *Thermoascus aurantiacus* com suas contrapartes homólogas. O alinhamento foi realizado usando o programa Needle do pacote de

20 programas EMBOSS. \* Indica uma  $\beta$ -glicosidase codificada por um gene clonado nesse trabalho.

| Organismo, enzima e número de acesso                            | Identidade (%) |
|-----------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>* <i>Acremonium thermophilum</i> <math>\beta</math>G_101</b> | 100,0          |
| <i>Magnaporthe grisea</i> $\beta$ -glucosidase, AY849670        | 73,1           |
| <i>Neurospora crassa</i> hypothetical, XM_330871                | 71,1           |
| <i>Trichoderma reesei</i> Cel3B, AY281374                       | 65,2           |
| <b>* <i>Thermoascus aurantiacus</i> <math>\beta</math>G_81</b>  | 62,2           |
| <i>Aspergillus aculeatus</i> $\beta$ -glucosidase, D64088       | 59,5           |
| <i>Talaromyces emersonii</i> $\beta$ -glucosidase, AY072918     | 58,9           |
| <i>Aspergillus oryzae</i> , AX616738                            | 58,2           |
| <i>Acremonium cellulolyticus</i> $\beta$ -glucosidase, BD168028 | 57,2           |
| <b>* <i>Chaetomium thermophilum</i> <math>\beta</math>G_76</b>  | 40,9           |

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O gene *xyn10A* de *Thermoascus aurantiacus* (SEQ ID Nº:17) foi ampliado diretamente do DNA genômico isolado por reação da PCR. Os iniciadores à frente (TTATACCGCGGGAAGCCATGGTTCGACCAACGATCC-TAC) e reverso (TTATAGGATCCACCGGTCTATACTCACTGCTG-CAGGTCCTG) que foram usados na ampliação do gene foram designados com base no gene *xynA* de *T. aurantiacus* publicado (AJ132635). As misturas da reação da PCR continham tampão 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Triton 0,1% X-100, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM dNTPs, 1 µM cada iniciador, 1 unidade de DNA polimerase Phusion<sup>TM</sup> DNA (Finnzymes, Finlândia) e aproximadamente 0,5 µg de DNA genômico de *Thermoascus*. As condições para reações da PCR foram como se segue: 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto de recombinação a 60-66°C, 3 minutos de extensão a 72°C e uma extensão final a

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<sup>(e)</sup> De acordo com Hong e outros, 1999.

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

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

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

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

| Organismo, enzima e número de acesso                    | Identidade (%) |
|---------------------------------------------------------|----------------|
| <b>* <i>Thermoascus aurantiacus</i> XYN_30</b>          | 100,0          |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> XynA, P23360             | 100,0          |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> XynA, AF127529           | 99,4           |
| <i>Aspergillus niger</i> xylanase, A62445               | 69,7           |
| <i>Aspergillus aculeatus</i> xylanase, AR137844         | 69,9           |
| <i>Aspergillus terreus</i> fam 10 xyn, DQ087436         | 65,0           |
| <i>Aspergillus sojae</i> , XynXI AB040414               | 63,8           |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> xylanase, AY583585       | 62,5           |
| <b>* <i>Acremonium thermophilum</i> XYN_60</b>          | 100,0          |
| <i>Humicola grisea</i> XYL I, AB001030                  | 67,1           |
| <i>Magnaporthe grisea</i> 70-15, hypothetical XM_364947 | 63,8           |
| <i>Aspergillus aculeatus</i> xylanase, AR149839         | 53,7           |
| <i>Talaromyces emersonii</i> xylanase, AX403831         | 51,8           |
| <i>Gibberella zeae</i> xylanase, AY575962               | 51,4           |
| <i>Magnaporthe grisea</i> XYL5, AY144348                | 48,5           |
| <i>Talaromyces emersonii</i> , AX172287                 | 46,9           |

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

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

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

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

5 <sup>(a)</sup> O cassete de expressão para transformação de *T. reesei* foi isolado da estrutura de vetor por digestão com *Eco*RI.

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

10

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

15

20

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

25

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

#### **Exemplo 24. Desempenho das celobioidrolases recombinantes na hidrólise**

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

(Ta Cel7A) de CBH de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242

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

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

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

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

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

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

Os substratos que se seguem foram usados no experimento:

5

Celulose cristalina (Avicel)

Fibra de espruce pré-tratada com vapor e lavada (impregnação com 3% peso/peso de SO<sub>2</sub> por 20 minutos, seguido por pré-tratamento de vapor a 215°C por 5 minutos), matéria seca 25,9% (ESPRUCE).

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

10

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

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

15

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

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

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

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

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

#### **Exemplo 25. Desempenho das endoglucanases recombinantes na hidrólise**

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

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

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

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

                  Os substratos que se seguem foram usados no experimento:

                  Fibra de espruce pré-tratada em vapor e lavada (impregnação com SO<sub>2</sub> a 3% por 20 minutos, seguido por pré-tratamento com vapor a 215°C por 5 minutos), matéria seca a 25,9% (ESPRUCE).

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

                  As endoglucanases a serem estudadas (dosagem de 840 nkat/g de matéria seca, com base na atividade da endoglucanase contra HIEC de acordo com IUPAC, 1987) foram também usadas com celobioidrolases de *T. reesei* (CBHI/Cel7A, 8,1 mg/g d.m. e CBHII/Cel6A, 2,0 mg/g d.m.) ou com Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* com CBD de *T. reesei* geneticamente  
30                   (10,1 mg/g d.m.). EGI (Cel7B) e EGII (Cel5A) de *T. reesei* purificados

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

- 5
- 10 **Tabela 31.** Produtos de hidrólise com preparações diferentes de endoglicanase quando usadas em conjunto com celobioidrolases de *T. reesei* ou com Cel7A de *T. aurantiacus* abrigando CBD de *T. reesei*. Produtos de reação após 48 horas de hidrólise como açúcares de redução (mg/mL), glicose medida como padrão. Abreviaturas: CBHI = (Cel7A) de celobioidrolase I de *T. reesei*; CBHII = (Cel6A) de celobioidrolase II de *T. reesei*; EGI = (cel7B) de endoglicanase I de *T. reesei*; EGII = (Cel5A) de endoglicanase II de *T. reesei*; bG =  $\beta$ -glicosidase (da Novozym 188); nd = não realizado.
- 15

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

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

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

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

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

Fibra de espruce explodida em vapor e lavada (impregnação com 3% peso/peso de SO<sub>2</sub> por 20 minutos, seguido por pré-tratamento com vapor a 215°C por 5 minutos), com matéria seca de 25,9% foi suspensa em 5 mL de 0,05 M tampão acetato de sódio na consistência de 10 mg/mL. Esse substrato foi hidrolisado usando diferentes misturas de enzima nos tubos de teste com agitação magnética no banho de água ajustado em diferentes temperaturas por 72 horas. Para cada ponto da amostra, uma triplicata dos tubos de teste foi retirada da hidrólise, fervida por 10 minutos a fim de terminar a hidrólise da enzima, centrifugada e o sobrenadante foi analisado quanto aos produtos de reação de hidrólise. Os espaços em branco contendo o substrato sozinho (apenas tampão foi adicionado ao invés das enzimas) fo-

ram também incubados nas condições correspondentes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Preparação termofílica de CBH contendo Cel7A de *Thermoascus aurantiacus* ALKO4242 com CBD geneticamente anexado de CBHI/Cel7A de *T. reesei* (Ta Cel7A + Tr CBD, Exemplo 15). O teor de proteína da preparação foi de 31 mg/mL.  
30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

hidrólise como açúcares de redução é apresentada na figura 11.

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

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

O procedimento conforme descrito no Exemplo 28 foi repetido com fibra de espruce explodida em vapor e lavada (impregnação com 3% peso/peso de SO<sub>2</sub> por 20 minutos, seguido por pré-tratamento com vapor a 215°C por 5 minutos com matéria seca de 25,9%) como substrato usando temperaturas de hidrólise de 45°C, 55°C e 60°C. As amostras foram tomadas da hidrólise após 24, 48 e 72 horas e tratadas conforme descrito acima. Os produtos de hidrólise foram quantificados usando o ensaio para reduzir os açúcares (Bemfeld, 1955), empregando glicose como padrão. Os resultados dos brancos do substrato foram subtraídos das amostras com enzimas, e a concentração dos produtos de hidrólise como açúcares de redução é apresentada na figura 12.

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

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

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

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

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

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

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

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

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

enzimas de *Trichoderma* e *Aspergillus*.

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

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

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

**Lista de Organismos Depositados**

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

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

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

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

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

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

## 10 Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Hong J., H. Tamaki, K. Yamamoto, and Kumagai H. (2003a)  
 Cloning of a gene codificando a thermostabile endo- $\beta$ -1,4-glicanase from  
 20 *Thermoascus aurantiacus* and its expressão in yeast. Biotech. Letters 25:  
 657-661.

- Hong J., Tamaki H., Yamamoto K. and Kumagai H. (2003b) Clo-  
 ning of a gene codificando thermostable cellobiohydrolase from *Thermoas-  
 cus aurantiacus* and its expressão in yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63:  
 25 42-50.

IUPAC (International Union of Pure e applied Chemistry) (1987).  
 Measurement of cellulase activities. Pure e appl. Chem. 59: 257-268.

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

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

L. (1993) High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglycanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241:515-522.

Kurabi A., Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Markov A., Skomarovsky A., Gusakov A., Okunev O., Sinitsyn A., Gregg D. Xie D. and Saddler J. (2005) Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Fir by novel e commercial fungal cellulases. Appl. Biochem and Biotechn. Vol 121-124:219-229.

Lever, M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem., 47:276-279.

Lo Leggio, L., Kalogiannis S., Bhat M. K., and Pickersgill R.W. (1999) High resolution structure and sequence of the *T. aurantiacus* xylanase I: implications for evolution of thermostability in familia 10 xylanases and enzymes with (beta) alpha-barrel architecture. Proteins 36(3):295-306.

Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951 ) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Needleman S. and Wunsch C. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. Journal of Molecular Biology 48, 443-453.

Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. and von Heijne G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering 10: 1-6.

Paloheimo M., Mäntylä A., Kalmo J., and Suominen P. (2003) High- yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. Appl. Env. Microbiol. 69: 7073-7082.

Parry N., Beever D., Owen E., Nerinckx W. Claeysens M, Van Beeumen J. and Bhat M. (2002) Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglycanase purified from *Thermoascus aurantiacus*, Arch, of Biochem. and Biophys. 404: 243-253.

Penttilä M., Nevalainen H., Rättö M., Salminen E. and Knowles J. (1987) A versatile transformation system for the cellulolytic fila-

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

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

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

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

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

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

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

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

Tenkanen, M., Puls, J. and Poutanen, K (1992) Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. Enzyme Microbiol. Technol. 14: 566-574. Tomme, P. McRae, S., Wood, T. e claeysens, M. (1988) Chromatographic separation of cellulolytic enzymes. Methods in Enzymol. 160: 187-192. 25

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

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

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

- Wyman, CE. (2001) Twenty years of trials, tribulations, and re-  
search progress in bioethanol technology. Applied Biochemistry and Biotech-  
nology 91-93:5-21.

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

```

<110> Roal
<120> Tratamento de material celulósico e enzimas úteis para o mesmo
10 <130> 2051999
    <160> 30
    <170> PatentIn version 3.1
    <210> 1
    <211> 3192
15 <212> DNA
    <213> Thermoascus aurantiacus
    <220>
    <221> CDS
    <222> (1514) .. (2122)
20 <223>
    <220>
    <221> íntron
    <222> (2123) .. (2187)
    <223>
25 <220>
    <221> CDS
    <222> (2188) .. (2949)
    <223>
    <400> 1
30 ctagaccttt atcctttcat ccgaccagac ttcccctttg accttggcgc cctgttgact 60
    acctacctac ctaggtaggt aacgtcgtcg accctcttga atgatcctcg tcacactgca 120
    aacatccgaa acatacgga aaagatgatt gggcatggat gcaggagaca tcgaatgagg 180

```

|    |                                                                     |      |
|----|---------------------------------------------------------------------|------|
|    | gcttagaagg aaatgaaaac ctgggaccag gacgctaggt acgatgaaat ccgccaatgg   | 240  |
|    | tgaaacttta agtcgtgcct acagcacagg ctctgtgaag attgcgctgt tcagacttaa   | 300  |
|    | tcttctcatc acagtccaag tctttatgaa aaggaaaaga gagagaagag cgctatttcg   | 360  |
|    | agctgtcggc ctcataggga gacagtcgag cataccagcg gtatcgacgt tagactcaac   | 420  |
| 5  | caagaataat gacgagaata aacacagaag tcaaccttga actgtatata agggttccag   | 480  |
|    | cagcagatag ttacttgcct aaagacaact ccccgagggc tctctgcata caccaggatg   | 540  |
|    | ttccggaatt attcactgct cgtttccgac gtggcgtcag tgatccgtct ccacagaacc   | 600  |
|    | tctacctggg gaataaccca ggggaggaat ctgcaagtaa gaacttaata ccaatccccg   | 660  |
|    | gggctgccgg ggtgaatcaa atctcccgcg ggaaattaaa cccatacgat gtttttgcac   | 720  |
| 10 | cacatgcatg cttggcacga tttctccgca agggagtcac agagaaagac atatttcgca   | 780  |
|    | tactactgtg actctgcaga gttacatata actcaggata cattgcagat cattgtccga   | 840  |
|    | gcatcaaaca tggacctgca ggatcaacgg cccgacaaaa cacaagtggc taaagctggg   | 900  |
|    | ggatgcccga acccgctgcg caatatcatt gatggatgtt cccccacatt tttaaaacat   | 960  |
|    | cgacggatcg gcccgcatac taatcctttt atcaacaaaa agttccactc gactagagaa   | 1020 |
| 15 | aaaaaggcca aggccactaa ttgcagtcgg atactgggtct tttcgccgtc caacaccttc  | 1080 |
|    | atccatgata cccttagcca ccaatgcccc acataatata tgttgacata ggtacgtagc   | 1140 |
|    | tctgttatcc aatcgcatcc gaacctcttt aacggacccc tcctacacac cttatcctaa   | 1200 |
|    | cttcaggaga ctgttgccca ttggggattg aggagggtccg ggttgacagga tgcgttctag | 1260 |
|    | gctaaattct cggccggtag ccatctcgaa tctctcgtga agccttcata tgaacggttg   | 1320 |
| 20 | gcggcccgtc aagccgatga ccatgggttc ctgatagagc ttgtgcctga ccggccttgg   | 1380 |
|    | cggcatagac gagctgaaca catcaggtat gaacagatca gatataaagt cggattgagt   | 1440 |
|    | cctagtacga agcaatccgc caccacaaaa tcaagcaacg agcgacagca ataacaatat   | 1500 |
|    | caatcgaatc gca atg tat cag cgc gct ctt ctc ttc tct ttc ttc ctc      | 1549 |
|    | Met Tyr Gln Arg Ala Leu Leu Phe Ser Phe Phe Leu                     |      |
| 25 | 1 5 10                                                              |      |
|    | gcc gcc gcc cgc gcg cag cag gcc ggt acc gta acc gca gag aat cac     | 1597 |
|    | Ala Ala Ala Arg Ala Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His     |      |
|    | 15 20 25                                                            |      |
|    | cct tcc ctg acc tgg cag caa tgc tcc agc ggc ggt agt tgt acc acg     | 1645 |
| 30 | Pro Ser Leu Thr Trp Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr     |      |
|    | 30 35 40                                                            |      |
|    | cag aat gga aaa gtc gtt atc gat gcg aac tgg cgt tgg gtc cat acc     | 1693 |

Gln Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr  
 45 50 55 60  
 acc tct gga tac acc aac tgc tac acg ggc aat acg tgg gac acc agt 1741  
 Thr Ser Gly Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser  
 5 65 70 75  
 atc tgt ccc gac gac gtg acc tgc gct cag aat tgt gcc ttg gat gga 1789  
 Ile Cys Pro Asp Asp Val Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ala Leu Asp Gly  
 80 85 90  
 gcg gat tac agt ggc acc tat ggt gtt acg acc agt ggc aac gcc ctg 1837  
 10 Ala Asp Tyr Ser Gly Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu  
 95 100 105  
 aga ctg aac ttt gtc acc caa agc tca ggg aag aac att ggc tcg cgc 1885  
 Arg Leu Asn Phe Val Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg  
 110 115 120  
 15 ctg tac ctg ctg cag gac gac acc act tat cag atc ttc aag ctg ctg 1933  
 Leu Tyr Leu Leu Gln Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu  
 125 130 135 140  
 ggt cag gag ttt acc ttc gat gtc gac gtc tcc aat ctc cct tgc ggc 1981  
 Gly Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly  
 20 145 150 155  
 ctg aac ggc gcc ctc tac ttt gtg gcc atg gac gcc gac ggc gga ttg 2029  
 Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu  
 160 165 170  
 tcc aaa tac cct ggc aac aag gca ggc gct aag tat ggc act ggt tac 2077  
 25 Ser Lys Tyr Pro Gly Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr  
 175 180 185  
 tgc gac tct cag tgc cct cgg gat ctc aag ttc atc aac ggt cag 2122  
 Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln  
 190 195 200  
 30 gtacgtcaga agtgataact agccagcaga gcccatgaat cattaactaa cgctgtcaaa 2182  
 tacag gcc aat gtt gaa ggc tgg cag ccg tct gcc aac gac cca aat gcc 2232

Ala Asn Val Glu Gly Trp Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala

205 210 215

ggc gtt ggt aac cac ggt tcc tgc tgc gct gag atg gat gtc tgg gaa 2280

Gly Val Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu

5 220 225 230

gcc aac agc atc tct act gcg gtg acg cct cac cca tgc gac acc ccc 2328

Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro

235 240 245 250

ggc cag acc atg tgc cag gga gac gac tgt ggt gga acc tac tcc tcc 2376

10 Gly Gln Thr Met Cys Gln Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser

255 260 265

act cga tat gct ggt acc tgc gac cct gat ggc tgc gac ttc aat cct 2424

Thr Arg Tyr Ala Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro

270 275 280

15 tac cgc cag ggc aac cac tcg ttc tac ggc ccc ggg cag atc gtc gac 2472

Tyr Arg Gln Gly Asn His Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp

285 290 295

acc agc tcc aaa ttc acc gtc gtc acc cag ttc atc acc gac gac ggg 2520

Thr Ser Ser Lys Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly

20 300 305 310

acc ccc tcc ggc acc ctg acg gag atc aaa cgc ttc tac gtc cag aac 2568

Thr Pro Ser Gly Thr Leu Thr Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn

315 320 325 330

ggc aag gta atc ccc cag tcg gag tcg acg atc agc ggc gtc acc ggc 2616

25 Gly Lys Val Ile Pro Gln Ser Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly

335 340 345

aac tca atc acc acc gag tat tgc acg gcc cag aag gcc gcc ttc ggc 2664

Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly

350 355 360

30 gac aac acc ggc ttc ttc acg cac ggc ggg ctt cag aag atc agt cag 2712

Asp Asn Thr Gly Phe Phe Thr His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln

365 370 375

gct ctg gct cag ggc atg gtc ctc gtc atg agc ctg tgg gac gat cac 2760  
 Ala Leu Ala Gln Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His  
 380 385 390  
 gcc gcc aac atg ctc tgg ctg gac agc acc tac ccg act gat gcg gac 2808  
 5 Ala Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp  
 395 400 405 410  
 ccg gac acc cct ggc gtc gcg cgc ggt acc tgc ccc acg acc tcc ggc 2856  
 Pro Asp Thr Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly  
 415 420 425  
 10 gtc ccg gcc gac gtt gag tcg cag tac ccc aat tca tat gtt atc tac 2904  
 Val Pro Ala Asp Val Glu Ser Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr  
 430 435 440  
 tcc aac atc aag gtc gga ccc atc aac tcg acc ttc acc gcc aac 2949  
 Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro Ile Asn Ser Thr Phe Thr Ala Asn  
 15 445 450 455  
 taagtaagta actggcactc taccaccgag agcttcgtga agatacaggg gtggttgga 3009  
 gattgtcgtg tacaggggac atgcgatgct caaaaatcta catcagtttg ccaattgaac 3069  
 catgaaaaaa agggggagat caaagaagtc tgtcaaaaga ggggggctgt ggcagcttaa 3129  
 gccttggtgt agatcgagtc gacgccctat agtgagtcgt attagagctc gcggccgcga 3189  
 20 gct 3192  
 <210> 2  
 <211> 457  
 <212> PRT  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*  
 25 <400> 2  
 Met Tyr Gln Arg Ala Leu Leu Phe Ser Phe Phe Leu Ala Ala Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr  
 20 25 30  
 30 Trp Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys  
 35 40 45

Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr  
 50 55 60  
 Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp  
 65 70 75 80  
 5 Asp Val Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser  
 85 90 95  
 Gly Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe  
 100 105 110  
 Val Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu  
 10 115 120 125  
 Gln Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe  
 130 135 140  
 Thr Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala  
 145 150 155 160  
 15 Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro  
 165 170 175  
 Gly Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln  
 180 185 190  
 Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly  
 20 195 200 205  
 Trp Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly  
 210 215 220  
 Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr  
 225 230 235 240  
 25 Ala Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln  
 245 250 255  
 Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr  
 260 265 270  
 Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His  
 30 275 280 285  
 Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr  
 290 295 300

Val Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln  
                          325                      330                      335  
 5 Ser Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu  
                          340                      345                      350  
 Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe  
                          355                      360                      365  
 Thr His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met  
 10                      370                      375                      380  
 Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp  
 385                      390                      395                      400  
 Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val  
                          405                      410                      415  
 15 Ala Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu  
                          420                      425                      430  
 Ser Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly  
                          435                      440                      445  
 Pro Ile Asn Ser Thr Phe Thr Ala Asn  
 20                      450                      455  
 <210> 3  
 <211> 3055  
 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum  
 25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (972)..(1595)  
 <223>  
 <220>  
 30 <221> Intron  
 <222> (1596)..(1729)  
 <223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1730)..(2290)  
 <223>  
 5 <220>  
 <221> Intron  
 <222> (2291)..(2412)  
 <223>  
 <220>  
 10 <221> CDS  
 <222> (2413)..(2540)  
 <223>  
 <220>  
 <221> Intron  
 15 <222> (2541)..(2627)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2628)..(2691)  
 20 <223>  
 <400> 3  
 gaattcggat cacaccgaga gcttcgcat gccagctgt ctcagcttgt acccgtctac 60  
 caacgttcg catcttcgtt accttgatag ctgcggttg ctggactgct ttgtgagggg 120  
 actgtgccac gcctgggaga cgggtgccgt accatcggtt actgcgcaga ctgagaaccg 180  
 25 tcgttgccga aacagccagg caggaagcct gtccaccttc atgtatcttc atatggaccc 240  
 cagcgcgccc ctctctttct cctcatttct tgcccaccac gatggacacc atgccaatct 300  
 atttcttgat cccttgactc ctcagccccc cagcagtcg acaatgtaca gtgatgggca 360  
 tctctttctg tacatacgtc ccctctcgcg gtgtccacgc gcggccgggg atgcctggga 420  
 cggagtgcc aacgcaggga acgagacttg gctgatgggg tgcggtgcat ggtggcaca 480  
 30 gagatccagg cccccgatc tcgttctcgc acgtatcctt cccccgccg cgatgcccaa 540  
 gtgggaagtc ttccgagcgg caccagggc catcttgccg atgcccgga cggctctggc 600  
 ggttccttc atctatcgtg gctgcacatc cgccgtgcc ccattgggaa agcaggcttt 660

|    |                                                                     |      |
|----|---------------------------------------------------------------------|------|
|    | gttcttcccg tctgtcgatc gtctcccacc taccctccct cctcgcaagg gcttaccctg   | 720  |
|    | gcccctcaact gctgcttcac ctcaactgctg cttccccgca atgccccctc gccccccccc | 780  |
|    | ccccctctc ctttgagta cagatctaca taatatcgag acgcccccca agctgtttct     | 840  |
|    | ctggcacagc cctctcgcgc gtggtgcaag agcaagtcag agtatcaatt cccccatctc   | 900  |
| 5  | tcattctcagc ccttctgccc tggtccaccc gacattctgg gcccgtagcc aagaccgatc  | 960  |
|    | cgctctcac c atg cac aag cgg gcg gcc acc ctc tcc gcc ctc gtc gtc     | 1010 |
|    | Met His Lys Arg Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Val Val                 |      |
|    | 1 5 10                                                              |      |
|    | gcc gcc gcc ggc ttc gcc cgc ggc cag ggc gtg ggc acg cag cag acg     | 1058 |
| 10 | Ala Ala Ala Gly Phe Ala Arg Gly Gln Gly Val Gly Thr Gln Gln Thr     |      |
|    | 15 20 25                                                            |      |
|    | gag acg cac ccc aag ctc acc ttc cag aag tgc tcc gcc gcc ggc agc     | 1106 |
|    | Glu Thr His Pro Lys Leu Thr Phe Gln Lys Cys Ser Ala Ala Gly Ser     |      |
|    | 30 35 40 45                                                         |      |
| 15 | tgc acg acc cag aac ggc gag gtg gtc atc gac gcc aac tgg cgc tgg     | 1154 |
|    | Cys Thr Thr Gln Asn Gly Glu Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp     |      |
|    | 50 55 60                                                            |      |
|    | gtg cac gac aag aac ggc tac acc aac tgc tac acg ggc aac gag tgg     | 1202 |
|    | Val His Asp Lys Asn Gly Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Glu Trp     |      |
| 20 | 65 70 75                                                            |      |
|    | aac acc acc atc tgc gcc gac gcc gcc tcg tgc gcc agc aac tgc gtc     | 1250 |
|    | Asn Thr Thr Ile Cys Ala Asp Ala Ala Ser Cys Ala Ser Asn Cys Val     |      |
|    | 80 85 90                                                            |      |
|    | gtc gac ggc gcc gac tac cag ggc acc tac ggc gcc tcc acc tcc ggc     | 1298 |
| 25 | Val Asp Gly Ala Asp Tyr Gln Gly Thr Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly     |      |
|    | 95 100 105                                                          |      |
|    | aac gcc ctg acc ctc aag ttc gtc acc aag ggc agc tac gcc acc aac     | 1346 |
|    | Asn Ala Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr Lys Gly Ser Tyr Ala Thr Asn     |      |
|    | 110 115 120 125                                                     |      |
| 30 | atc ggc tcg cgc atg tac ctg atg gcc agc ccc acc aag tac gcc atg     | 1394 |
|    | Ile Gly Ser Arg Met Tyr Leu Met Ala Ser Pro Thr Lys Tyr Ala Met     |      |
|    | 130 135 140                                                         |      |

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | ttc acc ctg ctg ggc cac gag ttc gcc ttc gac gtc gac ctg agc aag    | 1442 |
|    | Phe Thr Leu Leu Gly His Glu Phe Ala Phe Asp Val Asp Leu Ser Lys    |      |
|    | 145 150 155                                                        |      |
|    | ctg ccc tgc ggc ctc aac ggc gcc gtc tac ttc gtc agc atg gac gag    | 1490 |
| 5  | Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Val Tyr Phe Val Ser Met Asp Glu    |      |
|    | 160 165 170                                                        |      |
|    | gac ggc ggc acc agc aag tac ccc tcc aac aag gcc ggc gcc aag tac    | 1538 |
|    | Asp Gly Gly Thr Ser Lys Tyr Pro Ser Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr    |      |
|    | 175 180 185                                                        |      |
| 10 | ggc acg ggc tac tgc gac tcg cag tgt ccg cgc gac ctc aag ttt atc    | 1586 |
|    | Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile    |      |
|    | 190 195 200 205                                                    |      |
|    | gac ggc aag gtgagaaccc gcactagcgt ccgccttcc gtgtccctcc             | 1635 |
|    | Asp Gly Lys                                                        |      |
| 15 | ttttgccttc ttcgaccgcc ctcttcctg cgggccaggg tcgctggggt gctgtcctcc   | 1695 |
|    | tttctggtgg gcagcgggtgc tgatcccgcg ccag gcc aac tcg gcc agc tgg cag | 1750 |
|    | Ala Asn Ser Ala Ser Trp Gln                                        |      |
|    | 210 215                                                            |      |
|    | ccc tcg tcc aac gac cag aac gcc ggc gtg ggc ggc atg ggc tcg tgc    | 1798 |
| 20 | Pro Ser Ser Asn Asp Gln Asn Ala Gly Val Gly Gly Met Gly Ser Cys    |      |
|    | 220 225 230                                                        |      |
|    | tgc gcc gag atg gac atc tgg gag gcc aac tcc gtc tcc gcc gcc tac    | 1846 |
|    | Cys Ala Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Val Ser Ala Ala Tyr    |      |
|    | 235 240 245                                                        |      |
| 25 | acg ccg cac ccg tgc cag aac tac cag cag cac agc tgc agc ggc gac    | 1894 |
|    | Thr Pro His Pro Cys Gln Asn Tyr Gln Gln His Ser Cys Ser Gly Asp    |      |
|    | 250 255 260                                                        |      |
|    | gac tgc ggc ggc acc tac tcg gcc acc cgc ttc gcc ggc gac tgc gac    | 1942 |
|    | Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ala Thr Arg Phe Ala Gly Asp Cys Asp    |      |
| 30 | 265 270 275                                                        |      |
|    | ccg gac ggc tgc gac tgg aac gcc tac cgc atg ggc gtg cac gac ttc    | 1990 |

Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Ala Tyr Arg Met Gly Val His Asp Phe  
 280 285 290 295  
 tac ggc aac ggc aag acc gtc gac acc ggc aag aag ttc tcc atc gtc 2038  
 Tyr Gly Asn Gly Lys Thr Val Asp Thr Gly Lys Lys Phe Ser Ile Val  
 5 300 305 310  
 acc cag ttc aag ggc tcc ggc tcc acc ctg acc gag atc aag cag ttc 2086  
 Thr Gln Phe Lys Gly Ser Gly Ser Thr Leu Thr Glu Ile Lys Gln Phe  
 315 320 325  
 tac gtc cag gac ggc agg aag atc gag aac ccc aac gcc acc tgg ccc 2134  
 10 Tyr Val Gln Asp Gly Arg Lys Ile Glu Asn Pro Asn Ala Thr Trp Pro  
 330 335 340  
 ggc ctc gag ccc ttc aac tcc atc acc ccg gac ttc tgc aag gcc cag 2182  
 Gly Leu Glu Pro Phe Asn Ser Ile Thr Pro Asp Phe Cys Lys Ala Gln  
 345 350 355  
 15 aag cag gtc ttc ggc gac ccc gac cgc ttc aac gac atg ggc ggc ttc 2230  
 Lys Gln Val Phe Gly Asp Pro Asp Arg Phe Asn Asp Met Gly Gly Phe  
 360 365 370 375  
 acc aac atg gcc aag gcc ctg gcc aac ccc atg gtc ctg gtg ctg tcg 2278  
 Thr Asn Met Ala Lys Ala Leu Ala Asn Pro Met Val Leu Val Leu Ser  
 20 380 385 390  
 ctg tgg gac gac gtgagccatt ttgcattct ctctgactc tctccgctg 2330  
 Leu Trp Asp Asp  
 395  
 ccatcaccac ctcttcacc accgccacga ggggtgtagct tgatctccgc tgactgacgt 2390  
 25 gtgcccacac ccccgtttct ag cac tac tcc aac atg ctg tgg ctc gac tct 2442  
 His Tyr Ser Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser  
 400 405  
 acc tac ccg acc gac gcc gat ccc agc gcg ccc ggc aag gga cgt ggc 2490  
 Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Ser Ala Pro Gly Lys Gly Arg Gly  
 30 410 415 420  
 acc tgc gac acc agc agc ggc gtg cca agc gac gtg gag tcg aag aat 2538

Thr Cys Asp Thr Ser Ser Gly Val Pro Ser Asp Val Glu Ser Lys Asn  
425 430 435  
gg gtgagtcgga tcttctgcat gcggcccggt ttccgagcat tgcttggggt 2590  
Gly  
5 cctccctcag gctgacacac gcgcgccttc gatacag c gat gcg acc gtc atc 2643  
Asp Ala Thr Val Ile  
440  
tac tcc aac atc aag ttt ggg ccg ctg gac tcc acc tac acg gct tcc 2691  
Tyr Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Leu Asp Ser Thr Tyr Thr Ala Ser  
10 445 450 455  
tgagcagccg ctttgggttc ggtggggccg aagcacaaca agtgtgtgcg tagctgagat 2751  
gatggccgat ctctgtcctt tgtctcctag tgtctctctt atcgaacaac cccccgacct 2811  
gcagcgtcgg cgggcatcgt atagtctggt gtaactgtat atagctctgt gcgtgtgaat 2871  
cgaacgagca ccgacgaaat gtggtgtttc atgctatcgt acatgctctt gcgagatctg 2931  
15 aagtcgtcaa ttagacattg ccaccatcca acttggcgac tgtccaccgg gtccatttgt 2991  
atcactggct cttccgagac ccggtctctc tcacaccgta atcactgcaa gcagagttga 3051  
attc 3055  
<210> 4  
<211> 459  
20 <212> PRT  
<213> Acremonium thermophilum  
<400> 4  
Met His Lys Arg Ala Ala Thr Leu Ser Ala Leu Val Val Ala Ala Ala  
1 5 10 15  
25 Gly Phe Ala Arg Gly Gln Gly Val Gly Thr Gln Gln Thr Glu Thr His  
20 25 30  
Pro Lys Leu Thr Phe Gln Lys Cys Ser Ala Ala Gly Ser Cys Thr Thr  
35 40 45  
Gln Asn Gly Glu Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Asp  
30 50 55 60  
Lys Asn Gly Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Glu Trp Asn Thr Thr  
65 70 75 80

[illegible]

Asn Pro Asn Ala Thr Trp Pro Gly Leu Glu Pro Phe Asn Ser Ile Thr  
                   340                  345                  350  
 Pro Asp Phe Cys Lys Ala Gln Lys Gln Val Phe Gly Asp Pro Asp Arg  
                   355                  360                  365  
 5 Phe Asn Asp Met Gly Gly Phe Thr Asn Met Ala Lys Ala Leu Ala Asn  
                   370                  375                  380  
 Pro Met Val Leu Val Leu Ser Leu Trp Asp Asp His Tyr Ser Asn Met  
 385                  390                  395                  400  
 Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Ser Ala Pro  
 10                  405                  410                  415  
 Gly Lys Gly Arg Gly Thr Cys Asp Thr Ser Ser Gly Val Pro Ser Asp  
                   420                  425                  430  
 Val Glu Ser Lys Asn Gly Asp Ala Thr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys  
                   435                  440                  445  
 15 Phe Gly Pro Leu Asp Ser Thr Tyr Thr Ala Ser  
                   450                  455  
 <210> 5  
 <211> 3401  
 <212> DNA  
 20 <213> Acremonium thermophilum  
       <220>  
       <221> CDS  
       <222> (891)..(1299)  
       <223>  
 25 <220>  
       <221> Intron  
       <222> (1300)..(1387)  
       <223>  
       <220>  
 30 <221> CDS  
       <222> (1388)..(1442)  
       <223>

<220>  
 <221> Intron  
 <222> (1443)..(1495)  
 <223>  
 5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1496)..(1643)  
 <223>  
 <220>  
 10 <221> Intron  
 <222> (1644)..(1697)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (1698)..(1928)  
 <223>  
 <220>  
 <221> Intron  
 <222> (1929)..(2014)  
 20 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2015)..(2740)  
 <223>  
 25 <400> 5  
 ctcgagtttc cctggtcggc cactctctgc tcactctcgt ctgcgccctt ggatgtgccg 60  
 tgtgtccagt cgtgtatctc ttgaactgcac gacgtgttcc tcgcgactcg tctcgcgccg 120  
 gtggatgccc gtccactcat ttgtccgtct actgggtcag cctctcgtct cgaacgagct 180  
 tccacggccc actccccgga caacctcggc tctggatggc cctcctcccc ctccgtgtct 240  
 30 cccctctctgc ggggtccgtc gtgccctggc tgcattgtcc acatcgcttg atcacgtgc 300  
 gagccaccgc agagcccat ctocaaagcg accgtggcag cactacctct gtttctggga 360  
 tggggccac gtcgatggc tggcatcctc tgccaccctc ctccatcccc ctgacctcac 420

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | tcccaaccga taggagaagt ggtcatgggc acgaccccggt gcacgtcttg gactcgacga | 480  |
|    | gcttgatcgg gccggaagcc gtcaacgacg ggggagccgt gtcttgccac gcgtggccgt  | 540  |
|    | ccttcgacag tggacagcga gaaaactgggt ggggaagagg gctgctacag tcttgtcttg | 600  |
|    | cgaggccccga cgctcctagt ccgagaacca cctacgtgtt tctcgcaag acggggccag  | 660  |
| 5  | cttagcggcc aaatttgccc cccgggccta gggcttagcg atggggatga tgaactgggt  | 720  |
|    | tcgacgatgt ctatataacg acggcgatct cctgtctctg agatcccatc ctttcatctc  | 780  |
|    | caacccactt catcccttcc tctctctctc cccctccctt ctctgacata ccgagtcctc  | 840  |
|    | agaagcctcg tccgtcgtca cctattctca ctccccgcg aactccggcc atg tat      | 896  |
|    | Met Tyr                                                            |      |
| 10 | 1                                                                  |      |
|    | acc aag ttc gcc gcc ctc gcc gcc ctc gtg gcc acc gtc cgc ggc cag    | 944  |
|    | Thr Lys Phe Ala Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Thr Val Arg Gly Gln    |      |
|    | 5 10 15                                                            |      |
|    | gcc gcc tgc tcg ctc acc gcc gag acc cac ccg tcg ctg cag tgg cag    | 992  |
| 15 | Ala Ala Cys Ser Leu Thr Ala Glu Thr His Pro Ser Leu Gln Trp Gln    |      |
|    | 20 25 30                                                           |      |
|    | aag tgc acc gcg ccc ggc agc tgc acc acc gtc agc ggc cag gtc acc    | 1040 |
|    | Lys Cys Thr Ala Pro Gly Ser Cys Thr Thr Val Ser Gly Gln Val Thr    |      |
|    | 35 40 45 50                                                        |      |
| 20 | atc gac gcc aac tgg cgc tgg ctg cac cag acc aac agc agc acc aac    | 1088 |
|    | Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Gln Thr Asn Ser Ser Thr Asn    |      |
|    | 55 60 65                                                           |      |
|    | tgc tac acc ggc aac gag tgg gac acc agc atc tgc agc tcc gac acc    | 1136 |
|    | Cys Tyr Thr Gly Asn Glu Trp Asp Thr Ser Ile Cys Ser Ser Asp Thr    |      |
| 25 | 70 75 80                                                           |      |
|    | gac tgc gcc acc aag tgc tgc ctc gac ggc gcc gac tac acc ggc acc    | 1184 |
|    | Asp Cys Ala Thr Lys Cys Cys Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Thr Gly Thr    |      |
|    | 85 90 95                                                           |      |
|    | tac ggc gtc acc gcc agc ggc aac tcg ctc aac ctc aag ttc gtc acc    | 1232 |
| 30 | Tyr Gly Val Thr Ala Ser Gly Asn Ser Leu Asn Leu Lys Phe Val Thr    |      |
|    | 100 105 110                                                        |      |
|    | cag ggg ccc tac tcc aag aac atc ggc tcg cgc atg tac ctc atg gag    | 1280 |

|    |                                                                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|    | Gln Gly Pro Tyr Ser Lys Asn Ile Gly Ser Arg Met Tyr Leu Met Glu                                                    |      |
|    | 115                                  120                                  125                                  130 |      |
|    | tgc gag tcc aag tac cag g gtgagcatat agatcacatc ttctgtcact                                                         | 1329 |
|    | Ser Glu Ser Lys Tyr Gln                                                                                            |      |
| 5  | 135                                                                                                                |      |
|    | tgcgtccggtt tcgcacggca agcggtccag acgctaacgg gacggttctc ttctctag                                                   | 1387 |
|    | gc ttc act ctg ctg ggt cag gag ttt acc ttt gac gtg gac gtc tcc                                                     | 1434 |
|    | Gly Phe Thr Leu Leu Gly Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser                                                    |      |
|    | 140                                  145                                  150                                      |      |
| 10 | aac ctg gg gtaggtgatg acttctcccc catgagaaga gctctgctaa                                                             | 1482 |
|    | Asn Leu Gly                                                                                                        |      |
|    | ccgtgttgctc cag c tgc ggt ctg aac gga gcg ctg tac ttc gtg tcc atg                                                  | 1532 |
|    | Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ser Met                                                                    |      |
| 15 | 160                                  165                                                                           |      |
|    | gac ctg gac gcc gcc gtg tcc aag tac acc acc aac aag gcc gcc gcc                                                    | 1580 |
|    | Asp Leu Asp Gly Gly Val Ser Lys Tyr Thr Thr Asn Lys Ala Gly Ala                                                    |      |
|    | 170                                  175                                  180                                      |      |
|    | aag tac gcc acc gcc tac tgc gac tcc cag tgc ccg cgg gat ctg aag                                                    | 1628 |
| 20 | Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys                                                    |      |
|    | 185                                  190                                  195                                      |      |
|    | ttc atc aac gcc cag gtgggtcgag agacctctt cccctctcag tgaacgatgt                                                     | 1683 |
|    | Phe Ile Asn Gly Gln                                                                                                |      |
|    | 200                                                                                                                |      |
| 25 | ctgacctct ctag gcc aac atc gac gcc tgg caa ccg tgc tcc aac gac                                                     | 1733 |
|    | Ala Asn Ile Asp Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp                                                                    |      |
|    | 205                                  210                                  215                                      |      |
|    | gcc aac gcc gcc ctg ggg aac cac gcc agc tgc tgc tcc gag atg gac                                                    | 1781 |
|    | Ala Asn Ala Gly Leu Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ser Glu Met Asp                                                    |      |
| 30 | 220                                  225                                  230                                      |      |
|    | atc tgg gag gcc aac aag gtc tcc gcc gcc tac acg ccg cac ccc tgc                                                    | 1829 |

Ile Trp Glu Ala Asn Lys Val Ser Ala Ala Tyr Thr Pro His Pro Cys  
 235 240 245  
 acc acc atc ggc cag acc atg tgc acc ggc gac gac tgc ggc ggc acc 1877  
 Thr Thr Ile Gly Gln Thr Met Cys Thr Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr  
 5 250 255 260  
 tat tgc tgc gac cgc tat gcc ggc atc tgc gac ccc gac ggt tgc gat 1925  
 Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Ala Gly Ile Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp  
 265 270 275 280  
 ttt gtaggttctt tctctcgccg ctccctgacg acctatatgt gtgaaggac 1978  
 10 Phe  
 gcacagaaaa gacaaggcca aagctgacca gagcag aac tgc tac cgc atg ggc 2032  
 Asn Ser Tyr Arg Met Gly  
 285  
 15 gac acc agc ttc tac ggc ccc ggc aag acg gtc gac acc ggc tcc aag 2080  
 Asp Thr Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Lys Thr Val Asp Thr Gly Ser Lys  
 290 295 300  
 ttc acc gtc gtg acc cag ttc ctc acg ggc tcc gac ggc aac ctc agc 2128  
 Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Leu Thr Gly Ser Asp Gly Asn Leu Ser  
 20 305 310 315  
 gag atc aag cgc ttc tac gtg cag aac ggc aag gtc atc ccc aac tcc 2176  
 Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Asn Ser  
 320 325 330 335  
 gag tcc aag atc gcc ggc gtc tcc ggc aac tcc atc acc acc gac ttc 2224  
 25 Glu Ser Lys Ile Ala Gly Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Thr Asp Phe  
 340 345 350  
 tgc acc gcc cag aag acc gcc ttc ggc gac acc aac gtc ttc gag gag 2272  
 Cys Thr Ala Gln Lys Thr Ala Phe Gly Asp Thr Asn Val Phe Glu Glu  
 355 360 365  
 30 cgc ggc ggc ctc gcc cag atg ggc aag gcc ctg gcc gag ccc atg gtc 2320  
 Arg Gly Gly Leu Ala Gln Met Gly Lys Ala Leu Ala Glu Pro Met Val  
 370 375 380

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | ctg gtc ctg tcc gtc tgg gac gac cac gcc gtc aac atg ctc tgg ctc    | 2368 |
|    | Leu Val Leu Ser Val Trp Asp Asp His Ala Val Asn Met Leu Trp Leu    |      |
|    | 385 390 395                                                        |      |
|    | gac tcc acc tac ccc acc gac agc acc aag ccc ggc gcc gcc cgc ggc    | 2416 |
| 5  | Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ser Thr Lys Pro Gly Ala Ala Arg Gly    |      |
|    | 400 405 410 415                                                    |      |
|    | gac tgc ccc atc acc tcc ggc gtg ccc gcc gac gtc gag tcc cag gcg    | 2464 |
|    | Asp Cys Pro Ile Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser Gln Ala    |      |
|    | 420 425 430                                                        |      |
| 10 | ccc aac tcc aac gtc atc tac tcc aac atc cgc ttc ggc ccc atc aac    | 2512 |
|    | Pro Asn Ser Asn Val Ile Tyr Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile Asn    |      |
|    | 435 440 445                                                        |      |
|    | tcc acc tac acc ggc acc ccc agc ggc ggc aac ccc ccc ggc ggc ggg    | 2560 |
|    | Ser Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Gly    |      |
| 15 | 450 455 460                                                        |      |
|    | acc acc acc acc acc acc acc acc acc tcc aag ccc tcc ggc ccc acc    | 2608 |
|    | Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Lys Pro Ser Gly Pro Thr    |      |
|    | 465 470 475                                                        |      |
|    | acc acc acc aac ccc tcg ggt ccg cag cag acg cac tgg ggt cag tgc    | 2656 |
| 20 | Thr Thr Thr Asn Pro Ser Gly Pro Gln Gln Thr His Trp Gly Gln Cys    |      |
|    | 480 485 490 495                                                    |      |
|    | ggc ggc cag gga tgg acc ggc ccc acg gtc tgc cag agc ccc tac acc    | 2704 |
|    | Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Val Cys Gln Ser Pro Tyr Thr    |      |
|    | 500 505 510                                                        |      |
| 25 | tgc aag tac tcc aac gac tgg tac tcg cag tgc ctg taagccataa         | 2750 |
|    | Cys Lys Tyr Ser Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu                    |      |
|    | 515 520                                                            |      |
|    | gccccctgta cggtcggaag acggtggcaa cagacaaacc cctccccga gcacaccccc   | 2810 |
|    | cagggatcta aggggggtgt ggttaagaca taagaatgcg ccgtggcttg gcctacgcca  | 2870 |
| 30 | cggatcatgaa agtgcagtga aaatgggggc aagagtcgga aaaagtgagt ttgcttgcaa | 2930 |
|    | gggagagagg atgtcgagag gtgatgactt cgtttgtaca tagttggctc ttcgtgattg  | 2990 |
|    | ggaacgggag gagtgtcggg gggagccctc cagactcctt ggcctctccg ctggttccat  | 3050 |

ctttctcagt acatatacat ctgcattttc atccacgtct ctggcgtctc tggatgtgaa 3110  
 cgaatccgac aactggtggg ctgagatgaa tcgcaaggag agtatcttgc gaggatatca 3170  
 cagtcagaaa gtagcatttg agccactact aaaagggtcaa ccagtatgcg aagcttagca 3230  
 attatataca gcagctcaac ttcagaacga agtattgcat gtggcagaga atcttgggaa 3290  
 5 atgagccatg aagacctcgt cgagagagta cctctcaccg ccaaataacc agctagcggg 3350  
 ttgggagagg agcaatagga cgagcgcgat ggacagatat acgaactcga g 3401  
 <210> 6  
 <211> 523  
 <212> PRT  
 10 <213> Acremonium thermophilum  
 <400> 6  
 Met Tyr Thr Lys Phe Ala Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Thr Val Arg  
 1 5 10 15  
 Gly Gln Ala Ala Cys Ser Leu Thr Ala Glu Thr His Pro Ser Leu Gln  
 15 20 25 30  
 Trp Gln Lys Cys Thr Ala Pro Gly Ser Cys Thr Thr Val Ser Gly Gln  
 35 40 45  
 Val Thr Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Leu His Gln Thr Asn Ser Ser  
 50 55 60  
 20 Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Glu Trp Asp Thr Ser Ile Cys Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Asp Cys Ala Thr Lys Cys Cys Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Thr  
 85 90 95  
 Gly Thr Tyr Gly Val Thr Ala Ser Gly Asn Ser Leu Asn Leu Lys Phe  
 25 100 105 110  
 Val Thr Gln Gly Pro Tyr Ser Lys Asn Ile Gly Ser Arg Met Tyr Leu  
 115 120 125  
 Met Glu Ser Glu Ser Lys Tyr Gln Gly Phe Thr Leu Leu Gly Gln Glu  
 130 135 140  
 30 Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Gly Cys Gly Leu Asn Gly  
 145 150 155 160

Ala Leu Tyr Phe Val Ser Met Asp Leu Asp Gly Gly Val Ser Lys Tyr  
165 170 175

Thr Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser  
180 185 190

5 Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Ile Asp  
195 200 205

Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp Ala Asn Ala Gly Leu Gly Asn His  
210 215 220

Gly Ser Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Lys Val Ser  
10 225 230 235 240

Ala Ala Tyr Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Ile Gly Gln Thr Met Cys  
245 250 255

Thr Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Ala Gly  
260 265 270

15 Ile Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Ser Tyr Arg Met Gly Asp  
275 280 285

Thr Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Lys Thr Val Asp Thr Gly Ser Lys Phe  
290 295 300

Thr Val Val Thr Gln Phe Leu Thr Gly Ser Asp Gly Asn Leu Ser Glu  
20 305 310 315 320

Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Asn Ser Glu  
325 330 335

Ser Lys Ile Ala Gly Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Thr Asp Phe Cys  
340 345 350

25 Thr Ala Gln Lys Thr Ala Phe Gly Asp Thr Asn Val Phe Glu Glu Arg  
355 360 365

Gly Gly Leu Ala Gln Met Gly Lys Ala Leu Ala Glu Pro Met Val Leu  
370 375 380

Val Leu Ser Val Trp Asp Asp His Ala Val Asn Met Leu Trp Leu Asp  
30 385 390 395 400

Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ser Thr Lys Pro Gly Ala Ala Arg Gly Asp  
405 410 415

Cys Pro Ile Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser Gln Ala Pro  
 420 425 430  
 Asn Ser Asn Val Ile Tyr Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile Asn Ser  
 435 440 445  
 5 Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Gly Thr  
 450 455 460  
 Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Lys Pro Ser Gly Pro Thr Thr  
 465 470 475 480  
 Thr Thr Asn Pro Ser Gly Pro Gln Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly  
 10 485 490 495  
 Gly Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Val Cys Gln Ser Pro Tyr Thr Cys  
 500 505 510  
 Lys Tyr Ser Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 515 520  
 15 <210> 7  
 <211> 3649  
 <212> DNA  
 <213> Chaetomium thermophilum  
 <220>  
 20 <221> CDS  
 <222> (1290)..(2879)  
 <223>  
 <220>  
 <221> Intron  
 25 <222> (2880)..(2943)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2944)..(2949)  
 30 <223>  
 <400> 7  
 tctagagctg tcgacgcggc cgcgtaatac gactcactat agggcgaaga attcggatcg 60

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | gactagagct cgtcacgggc tcgcgccgac gaggcgatga ggacgaaggg ccgacataat  | 120  |
|    | ccgtacttta cgctacatga cgactctcga aaattgtaaa gggccggcat ttcggagcga  | 180  |
|    | gtgctgcgag ggcgcatcgc cggcgctacct ggaattcctg gaatggtaag caatggccag | 240  |
|    | caatggggcca ggtatggacc agcttgaate ctggttgccg cgtcaccagg cccagcatgg | 300  |
| 5  | tgcccagaat ggcccaccgt ggcccacgt cctaagaaac aagctgcgtc ccgcatcca    | 360  |
|    | aaaacgtcgt cttcggcgca cgtcctcgt ggtccccccg gctggacacc ctggctggcc   | 420  |
|    | ctccaatgag cggcatttgc cctgtcgcg cgtgtcggca accttaatcg actccatctc   | 480  |
|    | tcggctccac gccgtccatc ctgtcctcga cctcgtcacc tgtgtcctcc ttgccctccc  | 540  |
|    | ttgcccttcc ttgccctcgc caccgacgtc cacaatgtga cctgtctgcc cggagcgccc  | 600  |
| 10 | agcgccatgc accgtttggg cttgtgcgcg tgtgcgcagt ctccatcgag cgattcgacc  | 660  |
|    | gtgtgcctct ctccaccagc gttccccgcg ctctccatag tccatgctac ttcgagccgt  | 720  |
|    | tgccctcaca gctgccagcg gcatggctct gtcgggtctc cctctccttt tcccgtaag   | 780  |
|    | cgctgccata caattctccg tctgccccag tcttgaggc gccgtattc ccaatcgcc     | 840  |
|    | atggcactgg ccagcccgat ccatgttcga tcgagcttcg acgggcccgtg agccgtctgc | 900  |
| 15 | acggaggagc ttgcgagcct gcgaacctgg cggacctgga gaagcctggc ccatctccct  | 960  |
|    | ggatggagat actgggtgcg ctagcaccac ggcgtgccac ggccaagctc cggccgaccc  | 1020 |
|    | ggaggcgagg agagggttgc gttgctgtct tcggcggctg tcaggggcaa gggtaatcgt  | 1080 |
|    | caatgtggga aaaggggctc atctccatga gattcatgac tcggacatcg tctatataag  | 1140 |
|    | togagtcccc catctccaa cagccgattc tgctctcat cccatcacca cctcgtcca     | 1200 |
| 20 | caaccacgca gttgtgtaca tcaaaacaag ttcgctcctt ttacatcttc accacaaca   | 1260 |
|    | cagcacatcc tctcctttcg gctttcaag atg atg tat aag aag ttc gcc gct    | 1313 |
|    | Met Met Tyr Lys Lys Phe Ala Ala                                    |      |
|    | 1 5                                                                |      |
|    | ctc gcc gcc ctc gtg gct ggc gcc tcc gcc cag cag gct tgc tcc ctc    | 1361 |
| 25 | Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Ala Ser Ala Gln Gln Ala Cys Ser Leu    |      |
|    | 10 15 20                                                           |      |
|    | acc gct gag aac cac cct agc ctc acc tgg aag cgc tgc acc tct ggc    | 1409 |
|    | Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr Trp Lys Arg Cys Thr Ser Gly    |      |
|    | 25 30 35 40                                                        |      |
| 30 | ggc agc tgc tcg acc gtg aac ggc gcc gtc acc atc gat gcc aac tgg    | 1457 |
|    | Gly Ser Cys Ser Thr Val Asn Gly Ala Val Thr Ile Asp Ala Asn Trp    |      |

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | cgc tgg act cac acc gtc tcc ggc tcg acc aac tgc tac acc ggc aac | 1505 |
|    | Arg Trp Thr His Thr Val Ser Gly Ser Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn |      |
|    | 60 65 70                                                        |      |
|    | cag tgg gat acc tcc ctc tgc act gat ggc aag agc tgc gcc cag acc | 1553 |
| 5  | Gln Trp Asp Thr Ser Leu Cys Thr Asp Gly Lys Ser Cys Ala Gln Thr |      |
|    | 75 80 85                                                        |      |
|    | tgc tgc gtc gat ggc gct gac tac tct tcg acc tat ggt atc acc acc | 1601 |
|    | Cys Cys Val Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Ser Thr Tyr Gly Ile Thr Thr |      |
|    | 90 95 100                                                       |      |
| 10 | agc ggt gac tcc ctg aac ctc aag ttc gtc acc aag cac cag tac ggc | 1649 |
|    | Ser Gly Asp Ser Leu Asn Leu Lys Phe Val Thr Lys His Gln Tyr Gly |      |
|    | 105 110 115 120                                                 |      |
|    | acc aac gtc ggc tcc cgt gtc tat ctg atg gag aac gac acc aag tac | 1697 |
|    | Thr Asn Val Gly Ser Arg Val Tyr Leu Met Glu Asn Asp Thr Lys Tyr |      |
| 15 | 125 130 135                                                     |      |
|    | cag atg ttc gag ctc ctc ggc aac gag ttc acc ttc gat gtc gat gtc | 1745 |
|    | Gln Met Phe Glu Leu Leu Gly Asn Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val |      |
|    | 140 145 150                                                     |      |
|    | tcc aac ctg ggc tgc ggt ctc aac ggc gcc ctc tac ttc gtt tcc atg | 1793 |
| 20 | Ser Asn Leu Gly Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ser Met |      |
|    | 155 160 165                                                     |      |
|    | gat gct gat ggt ggc atg agc aaa tac tct ggc aac aag gct ggc gcc | 1841 |
|    | Asp Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys Tyr Ser Gly Asn Lys Ala Gly Ala |      |
|    | 170 175 180                                                     |      |
| 25 | aag tac ggt acc ggc tac tgc gat gct cag tgc ccg cgc gac ctc aag | 1889 |
|    | Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys |      |
|    | 185 190 195 200                                                 |      |
|    | ttc atc aac ggc gag gcc aac gtt ggg aac tgg acc ccc tcg acc aac | 1937 |
|    | Phe Ile Asn Gly Glu Ala Asn Val Gly Asn Trp Thr Pro Ser Thr Asn |      |
| 30 | 205 210 215                                                     |      |
|    | gat gcc aac gcc ggc ttc ggc cgc tat ggc agc tgc tgc tct gag atg | 1985 |

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|    | Asp | Ala | Asn | Ala | Gly | Phe | Gly | Arg | Tyr | Gly | Ser | Cys | Cys | Ser | Glu | Met |      |
|    |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |      |
|    | gat | gtc | tgg | gag | gcc | aac | aac | atg | gct | act | gcc | ttc | act | cct | cac | cct | 2033 |
|    | Asp | Val | Trp | Glu | Ala | Asn | Asn | Met | Ala | Thr | Ala | Phe | Thr | Pro | His | Pro |      |
| 5  |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |     |     |     | 245 |     |     |      |
|    | tgc | acc | acc | gtt | ggc | cag | agc | cgc | tgc | gag | gcc | gac | acc | tgc | ggg | ggc | 2081 |
|    | Cys | Thr | Thr | Val | Gly | Gln | Ser | Arg | Cys | Glu | Ala | Asp | Thr | Cys | Gly | Gly |      |
|    |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     | 260 |     |     |      |
|    | acc | tac | agc | tct | gac | cgc | tat | gct | ggg | gtt | tgc | gac | cct | gat | ggc | tgc | 2129 |
| 10 | Thr | Tyr | Ser | Ser | Asp | Arg | Tyr | Ala | Gly | Val | Cys | Asp | Pro | Asp | Gly | Cys |      |
|    | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |      |
|    | gac | ttc | aac | gcc | tac | cgc | caa | ggc | gac | aag | acc | ttc | tac | ggc | aag | ggc | 2177 |
|    | Asp | Phe | Asn | Ala | Tyr | Arg | Gln | Gly | Asp | Lys | Thr | Phe | Tyr | Gly | Lys | Gly |      |
|    |     |     |     | 285 |     |     |     | 290 |     |     |     |     |     | 295 |     |     |      |
| 15 | atg | act | gtc | gac | acc | aac | aag | aag | atg | acc | gtc | gtc | acc | cag | ttc | cac | 2225 |
|    | Met | Thr | Val | Asp | Thr | Asn | Lys | Lys | Met | Thr | Val | Val | Thr | Gln | Phe | His |      |
|    |     |     | 300 |     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |      |
|    | aag | aac | tgc | gct | ggc | gtc | ctc | agc | gag | atc | aag | cgc | ttc | tac | gtc | cag | 2273 |
|    | Lys | Asn | Ser | Ala | Gly | Val | Leu | Ser | Glu | Ile | Lys | Arg | Phe | Tyr | Val | Gln |      |
| 20 |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |      |
|    | gac | ggc | aag | atc | att | gcc | aac | gct | gag | tcc | aag | atc | ccc | ggc | aac | ccc | 2321 |
|    | Asp | Gly | Lys | Ile | Ile | Ala | Asn | Ala | Glu | Ser | Lys | Ile | Pro | Gly | Asn | Pro |      |
|    |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |      |
|    | gga | aac | tcc | att | acc | cag | gag | tat | tgc | gat | gcc | cag | aag | gtc | gcc | ttc | 2369 |
| 25 | Gly | Asn | Ser | Ile | Thr | Gln | Glu | Tyr | Cys | Asp | Ala | Gln | Lys | Val | Ala | Phe |      |
|    | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |      |
|    | agt | aac | acc | gat | gac | ttc | aac | cgc | aag | ggc | ggg | atg | gct | cag | atg | agc | 2417 |
|    | Ser | Asn | Thr | Asp | Asp | Phe | Asn | Arg | Lys | Gly | Gly | Met | Ala | Gln | Met | Ser |      |
|    |     |     |     | 365 |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |      |
| 30 | aag | gcc | ctc | gca | ggc | ccc | atg | gtc | ctg | gtc | atg | tcc | gtc | tgg | gat | gac | 2465 |
|    | Lys | Ala | Leu | Ala | Gly | Pro | Met | Val | Leu | Val | Met | Ser | Val | Trp | Asp | Asp |      |
|    |     |     |     | 380 |     |     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |      |

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | cac tac gcc aac atg ctc tgg ctc gac tcg acc tac ccc atc gac cag    | 2513 |
|    | His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Ile Asp Gln    |      |
|    | 395 400 405                                                        |      |
|    | gcc ggc gcc ccc ggc gcc gag cgc ggt gct tgc ccg acc acc tcc ggt    | 2561 |
| 5  | Ala Gly Ala Pro Gly Ala Glu Arg Gly Ala Cys Pro Thr Thr Ser Gly    |      |
|    | 410 415 420                                                        |      |
|    | gtc cct gcc gag atc gag gcc cag gtc ccc aac agc aac gtc atc ttc    | 2609 |
|    | Val Pro Ala Glu Ile Glu Ala Gln Val Pro Asn Ser Asn Val Ile Phe    |      |
|    | 425 430 435 440                                                    |      |
| 10 | tcc aac atc cgt ttc ggc ccc atc ggc tcg acc gtc cct ggc ctt gac    | 2657 |
|    | Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Val Pro Gly Leu Asp    |      |
|    | 445 450 455                                                        |      |
|    | ggc agc aac ccc ggc aac ccg acc acc acc gtc gtt cct ccc gct tct    | 2705 |
|    | Gly Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr Thr Thr Val Val Pro Pro Ala Ser    |      |
| 15 | 460 465 470                                                        |      |
|    | acc tcc acc tcc cgt ccg acc agc agc act agc tct ccc gtt tcg acc    | 2753 |
|    | Thr Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Ser Thr    |      |
|    | 475 480 485                                                        |      |
|    | ccg act ggc cag ccc ggc ggc tgc acc acc cag aag tgg ggc cag tgc    | 2801 |
| 20 | Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp Gly Gln Cys    |      |
|    | 490 495 500                                                        |      |
|    | ggc ggt atc ggc tac acc ggc tgc act aac tgc gtt gct ggc acc acc    | 2849 |
|    | Gly Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala Gly Thr Thr    |      |
|    | 505 510 515 520                                                    |      |
| 25 | tgc act cag ctc aac ccc tgg tac agc cag gtatgtttct cttccccctt      | 2899 |
|    | Cys Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr Ser Gln                            |      |
|    | 525 530                                                            |      |
|    | ctagactcgc ttggatttga cagttgctaa catctgctca acag tgc ctg           | 2949 |
|    | Cys Leu                                                            |      |
| 30 | taaacaactc gcttcgttcg caccagcgag gagggccatg agaaagaatg ggcaacatag  | 3009 |
|    | attcttttgcg cggttgtgga ctacttgggt attttctgga tgtacatagt tttatcacgt | 3069 |
|    | catgaggctg tcatgtgggg atgtgtatct ttttcgcttc ttcgtacata aatttacgca  | 3129 |

ttgagctttt cccccccaa aaacagttcc ctgatttgct ggagtaactt gatggtaaag 3189  
 cttggtcata agctcttcaa tggaaaaaac gatacagtea tgccttgaca catcctccca 3249  
 aagtcttcgt ccatgacatc acggtcgatc cttaaqcaca agttcaataa ccccatgtgg 3309  
 cgttgcccttg tcttgaaca cagatgagat cttcagccca gccgcacgg ccacttcctt 3369  
 5 gaactgagcc aacgagcgtt ccttcccgcc gattgagagc atcgcatagt ccttgaaggc 3429  
 tgcatagaga ggaatagggg gcttggttcc ggtagttggg ctgccggaac tcggatctgt 3489  
 tggcgcaagg gggtcagggt tgatctgctc ggcatgagg acgcgtccat cggggtttgt 3549  
 tagtgcacga ggcacattgc gcaggatggt gactgccaca gggtcggagt aatcgcgag 3609  
 gatgtggcgg aggtagtaga ccagtgcacc tggaatcgat 3649  
 10 <210> 8  
 <211> 532  
 <212> PRT  
 <213> Chaetomium thermophilum  
 <400> 8  
 15 Met Met Tyr Lys Lys Phe Ala Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Gln Gln Ala Cys Ser Leu Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu  
 20 25 30  
 Thr Trp Lys Arg Cys Thr Ser Gly Gly Ser Cys Ser Thr Val Asn Gly  
 20 35 40 45  
 Ala Val Thr Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Thr Val Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Gln Trp Asp Thr Ser Leu Cys Thr  
 65 70 75 80  
 25 Asp Gly Lys Ser Cys Ala Gln Thr Cys Cys Val Asp Gly Ala Asp Tyr  
 85 90 95  
 Ser Ser Thr Tyr Gly Ile Thr Thr Ser Gly Asp Ser Leu Asn Leu Lys  
 100 105 110  
 Phe Val Thr Lys His Gln Tyr Gly Thr Asn Val Gly Ser Arg Val Tyr  
 30 115 120 125  
 Leu Met Glu Asn Asp Thr Lys Tyr Gln Met Phe Glu Leu Leu Gly Asn  
 130 135 140

Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Gly Cys Gly Leu Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys  
 165 170 175  
 5 Tyr Ser Gly Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp  
 180 185 190  
 Ala Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Glu Ala Asn Val  
 195 200 205  
 Gly Asn Trp Thr Pro Ser Thr Asn Asp Ala Asn Ala Gly Phe Gly Arg  
 10 210 215 220  
 Tyr Gly Ser Cys Cys Ser Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Asn Met  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Ala Phe Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Ser Arg  
 245 250 255  
 15 Cys Glu Ala Asp Thr Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Ala  
 260 265 270  
 Gly Val Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Ala Tyr Arg Gln Gly  
 275 280 285  
 Asp Lys Thr Phe Tyr Gly Lys Gly Met Thr Val Asp Thr Asn Lys Lys  
 20 290 295 300  
 Met Thr Val Val Thr Gln Phe His Lys Asn Ser Ala Gly Val Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asp Gly Lys Ile Ile Ala Asn Ala  
 325 330 335  
 25 Glu Ser Lys Ile Pro Gly Asn Pro Gly Asn Ser Ile Thr Gln Glu Tyr  
 340 345 350  
 Cys Asp Ala Gln Lys Val Ala Phe Ser Asn Thr Asp Asp Phe Asn Arg  
 355 360 365  
 Lys Gly Gly Met Ala Gln Met Ser Lys Ala Leu Ala Gly Pro Met Val  
 30 370 375 380  
 Leu Val Met Ser Val Trp Asp Asp His Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu  
 385 390 395 400

Asp Ser Thr Tyr Pro Ile Asp Gln Ala Gly Ala Pro Gly Ala Glu Arg  
 405 410 415  
 Gly Ala Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Glu Ile Glu Ala Gln  
 420 425 430  
 5 Val Pro Asn Ser Asn Val Ile Phe Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile  
 435 440 445  
 Gly Ser Thr Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly Asn Pro Thr  
 450 455 460  
 Thr Thr Val Val Pro Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg Pro Thr Ser  
 10 465 470 475 480  
 Ser Thr Ser Ser Pro Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gly Cys  
 485 490 495  
 Thr Thr Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Cys  
 500 505 510  
 15 Thr Asn Cys Val Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn Pro Trp Tyr  
 515 520 525  
 Ser Gln Cys Leu  
 530  
 <210> 9  
 20 <211> 1339  
 <212> DNA  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*  
 <220>  
 <221> CDS  
 25 <222> (17)..(122)  
 <223>  
 <220>  
 <221> Intron  
 <222> (123)..(177)  
 30 <223>  
 <220>  
 <221> CDS

<222> (178)..(236)  
<223>  
<220>  
<221> intron  
5 <222> (237)..(296)  
<223>  
<220>  
<221> CDS  
<222> (297)..(449)  
10 <223>  
<220>  
<221> intron  
<222> (450)..(508)  
<223>  
15 <220>  
<221> CDS  
<222> (509)..(573)  
<223>  
<220>  
20 <221> intron  
<222> (574)..(647)  
<223>  
<220>  
<221> CDS  
25 <222> (648)..(745)  
<223>  
<220>  
<221> intron  
<222> (746)..(806)  
30 <223>  
<220>  
<221> CDS

&lt;222&gt; (807)..(1330)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 9

```

5      cgcgggactg cgcatac atg aag ctc ggc tct ctc gtg ctc gct ctc agc gca      52
      Met Lys Leu Gly Ser Leu Val Leu Ala Leu Ser Ala
      1              5              10
      gct agg ctt aca ctg tcg gcc cct ctc gca gac agg aag cag gag acc      100
      Ala Arg Leu Thr Leu Ser Ala Pro Leu Ala Asp Arg Lys Gln Glu Thr
      15              20              25
10     aag cgt gcg aaa gta ttc caa t gttcgtaaca tccacgtctg gcttgctggc      152
      Lys Arg Ala Lys Val Phe Gln
      30              35
      ttactggcaa ctgacaatgg cgaag gg ttc ggt tca aac gag tcc ggt gct      203
      Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala
      15              40
      gaa ttc gga agc cag aac ctt cca gga gtc gag gtcagcatgc ctgtactctc      256
      Glu Phe Gly Ser Gln Asn Leu Pro Gly Val Glu
      45              50              55
      tgcattatat taatatctca agaggcttac tctttcgcag gga aag gat tat ata      311
      Gly Lys Asp Tyr Ile
      20              60
      tgg cct gat ccc aac acc att gac aca ttg atc agc aag ggg atg aac      359
      Trp Pro Asp Pro Asn Thr Ile Asp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Met Asn
      65              70              75
25     atc ttt cgt gtc ccc ttt atg atg gag aga ttg gtt ccc aac tca atg      407
      Ile Phe Arg Val Pro Phe Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Ser Met
      80              85              90
      acc ggc tct ccg gat ccg aac tac ctg gca gat ctc ata gcg      449
      Thr Gly Ser Pro Asp Pro Asn Tyr Leu Ala Asp Leu Ile Ala
      30              95              100              105
      gtacatttca attccaccat gtttggagct gtcttcgctg tgctgacatt taatggtag      508
      act gta aat gca atc acc cag aaa ggt gcc tac gcc gtc gtc gat cct      556

```

Thr Val Asn Ala Ile Thr Gln Lys Gly Ala Tyr Ala Val Val Asp Pro  
 110 115 120  
 cat aac tac ggc aga ta gtgaggtccc cggttctggt attgctgctg 603  
 His Asn Tyr Gly Arg Tyr  
 5 125  
 tataatctaag tagatatgtg tttctaacat ttccacgatt tcag c tac aat tct 657  
 Tyr Asn Ser  
 130  
 ata atc tcg agc cct tcc gat ttc cag acc ttc tgg aaa acg gtc gcc 705  
 10 Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys Thr Val Ala  
 135 140 145  
 tca cag ttt gct tcg aat cca ctg gtc atc ttc gac act a gtaagctgaa 755  
 Ser Gln Phe Ala Ser Asn Pro Leu Val Ile Phe Asp Thr  
 150 155 160  
 15 caccgcgaaat taactgagtc tgagcatgtc tgacaagacg atccatgaaa g at aac 811  
 Asn Asn  
 gaa tac cac gat atg gac cag acc tta gtc ctc aat ctc aac cag gcc 859  
 Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn Gln Ala  
 20 165 170 175  
 gct atc gac ggc atc cgt tcc gcc gga gcc act tcc cag tac atc ttt 907  
 Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile Phe  
 180 185 190  
 gtc gag ggc aat tcg tgg acc ggg gca tgg acc tgg acg aac gtg aac 955  
 25 Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Asn Val Asn  
 195 200 205 210  
 gat aac atg aaa agc ctg acc gac cca tct gac aag atc ata tac gag 1003  
 Asp Asn Met Lys Ser Leu Thr Asp Pro Ser Asp Lys Ile Ile Tyr Glu  
 215 220 225  
 30 atg cac cag tac ctg gac tct gac gga tcc ggg aca tca gcg acc tgc 1051  
 Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala Thr Cys  
 230 235 240

gta tct tcg acc atc ggt caa gag cga atc acc agc gca acg caa tgg 1099  
 Val Ser Ser Thr Ile Gly Gln Glu Arg Ile Thr Ser Ala Thr Gln Trp  
 245 250 255  
 ctc agg gcc aac ggg aag aag ggc atc atc ggc gag ttt gcg ggc gga 1147  
 5 Leu Arg Ala Asn Gly Lys Lys Gly Ile Ile Gly Glu Phe Ala Gly Gly  
 260 265 270  
 gcc aac gac gtc tgc gag acg gcc atc acg ggc atg ctg gac tac atg 1195  
 Ala Asn Asp Val Cys Glu Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Asp Tyr Met  
 275 280 285 290  
 10 gcc cag aac acg gac gtc tgg act ggc gcc atc tgg tgg gcg gcc ggg 1243  
 Ala Gln Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala Ala Gly  
 295 300 305  
 ccg tgg tgg gga gac tac ata ttc tcc atg gag ccg gac aat ggc atc 1291  
 Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Asp Asn Gly Ile  
 15 310 315 320  
 gcg tat cag cag ata ctt cct att ttg act ccg tat ctt tgactgcag 1339  
 Ala Tyr Gln Gln Ile Leu Pro Ile Leu Thr Pro Tyr Leu  
 325 330 335  
 <210> 10  
 20 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*  
 <400> 10  
 Met Lys Leu Gly Ser Leu Val Leu Ala Leu Ser Ala Ala Arg Leu Thr  
 25 1 5 10 15  
 Leu Ser Ala Pro Leu Ala Asp Arg Lys Gln Glu Thr Lys Arg Ala Lys  
 20 25 30  
 Val Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser  
 35 40 45  
 30 Gln Asn Leu Pro Gly Val Glu Gly Lys Asp Tyr Ile Trp Pro Asp Pro  
 50 55 60

Asn Thr Ile Asp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Met Asn Ile Phe Arg Val  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Pro Phe Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Ser Met Thr Gly Ser Pro  
                                     85                                      90                                      95  
 5    Asp Pro Asn Tyr Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Val Asn Ala Ile Thr  
                                     100                                      105                                      110  
 Gln Lys Gly Ala Tyr Ala Val Val Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr  
                                     115                                      120                                      125  
 Tyr Asn Ser Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys  
 10                                      130                                      135                                      140  
 Thr Val Ala Ser Gln Phe Ala Ser Asn Pro Leu Val Ile Phe Asp Thr  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Asn Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn  
                                     165                                      170                                      175  
 15    Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr  
                                     180                                      185                                      190  
 Ile Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Asn  
                                     195                                      200                                      205  
 Val Asn Asp Asn Met Lys Ser Leu Thr Asp Pro Ser Asp Lys Ile Ile  
 20                                      210                                      215                                      220  
 Tyr Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Thr Cys Val Ser Ser Thr Ile Gly Gln Glu Arg Ile Thr Ser Ala Thr  
                                     245                                      250                                      255  
 25    Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Lys Gly Ile Ile Gly Glu Phe Ala  
                                     260                                      265                                      270  
 Gly Gly Ala Asn Asp Val Cys Glu Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Asp  
                                     275                                      280                                      285  
 Tyr Met Ala Gln Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala  
 30                                      290                                      295                                      300  
 Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Asp Asn  
 305                                      310                                      315                                      320

Gly Ile Ala Tyr Gln Gln Ile Leu Pro Ile Leu Thr Pro Tyr Leu

325

330

335

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 2334

5

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acremonium thermophilum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (13)..(13)

10

&lt;223&gt; N = unidentified

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (715)..(797)

&lt;223&gt;

15

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

&lt;222&gt; (798)..(856)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

20

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (857)..(1105)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

25

&lt;222&gt; (1106)..(1228)

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1229)..(1787)

30

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

tctgtctctt gtntcagaac agatctcttg gcggcctgct ttgccggtcc gaattgcgat

60

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | cgatgcaacg tgcattgcat acgagctaag cccgtctcgt gataaccgca aggggtcttc  | 120  |
|    | cgagtttctg tctgcgaccc aggcattttc cgatttgtgt gcggggaccc aactgtcttc  | 180  |
|    | tggggagtac ctggtgacaa aagcacagat aaacagatgg atgacggtat tgctgtgata  | 240  |
|    | tcgccgtggc gctgaatcct ttctcttcgc taccaagata ttattcccc gttgtgaaat   | 300  |
| 5  | cttctattca gcccatccca tccggcaaca cgcattctgt ttctgttccg gcattccgat  | 360  |
|    | acctggttcc tggagtgcct accgagcctc gcttctctggg atcgggctgt gcaccccgcc | 420  |
|    | aaaccctatg ccccaaacgg tacggacaag gatgccggac cccggttttg tccagaaagg  | 480  |
|    | ttgcattcct acccacctcg ctggagccac aacatgcaga tcaccgcccg agggaggaca  | 540  |
|    | tgtgtggtgc agggacgttg gcaactctgc tgtgtctgaa gtatatgagg ccgatggttc  | 600  |
| 10 | tccttgacaa aagcagagaa tggagtagcc agctcctcct caccagagtc gcctttgcag  | 660  |
|    | cgtctcgga ttgcaggctc cccatcgtca gcatttcact tctcagcaac gaac atg     | 717  |
|    | Met                                                                |      |
|    | 1                                                                  |      |
|    | cgc tcc tca ccc ttt ctc cgc gca gct ctg gct gcc gct ctg cct ctg    | 765  |
| 15 | Arg Ser Ser Pro Phe Leu Arg Ala Ala Leu Ala Ala Ala Leu Pro Leu    |      |
|    | 5 10 15                                                            |      |
|    | agc gcc cat gcc ctc gac gga aag tgc acg ag gtatgccaat cctcgtacct   | 817  |
|    | Ser Ala His Ala Leu Asp Gly Lys Ser Thr Arg                        |      |
|    | 20 25                                                              |      |
| 20 | ctgccctctg tagaaacaag tgaccgactg caaagacag a tac tgg gac tgc tgc   | 872  |
|    | Tyr Trp Asp Cys Cys                                                |      |
|    | 30                                                                 |      |
|    | aag ccg tcc tgc ggc tgg ccg gga aag gcc tgc gtg aac cag ccc gtc    | 920  |
|    | Lys Pro Ser Cys Gly Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Asn Gln Pro Val    |      |
| 25 | 35 40 45                                                           |      |
|    | ttc tgc tgc tgc gcc gac tgg cag cgc atc agc gac ttc aac gcg aag    | 968  |
|    | Phe Ser Cys Ser Ala Asp Trp Gln Arg Ile Ser Asp Phe Asn Ala Lys    |      |
|    | 50 55 60 65                                                        |      |
|    | tcg ggc tgc gac gga ggc tcc gcc tac tgc tgc gcc gac cag acg ccc    | 1016 |

|    |                                                                   |      |
|----|-------------------------------------------------------------------|------|
|    | Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr Pro   |      |
|    | 70 75 80                                                          |      |
|    | tgg gcg gtc aac gac aac ttc tcg tac ggc ttc gca gcc acg gcc atc   | 1064 |
|    | Trp Ala Val Asn Asp Asn Phe Ser Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ala Ile   |      |
| 5  | 85 90 95                                                          |      |
|    | gcc ggc ggc tcc gag tcc agc tgg tgc tgc gcc tgc tat gc            | 1105 |
|    | Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala           |      |
|    | 100 105 110                                                       |      |
|    | gtgagttctc tgcaagccgc ttcccacccc cgctttctgt gcaggccgct tccccctac  | 1165 |
| 10 | ccaccacatt cccccccccc gcctctgtga tcgggcatcc gagctaagtt gcgtgtcgtc | 1225 |
|    | cag a ctc acc ttc aac tcg ggc ccc gtc gcg ggc aag acc atg gtg gtg | 1274 |
|    | Leu Thr Phe Asn Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val       |      |
|    | 115 120 125                                                       |      |
|    | cag tcg acc agc acc ggc ggc gac ctg ggc agc aac cag ttc gac ctc   | 1322 |
| 15 | Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn Gln Phe Asp Leu   |      |
|    | 130 135 140                                                       |      |
|    | gcc atc ccc ggc ggc ggc gtg ggc atc ttc aac ggc tgc gcc tcc cag   | 1370 |
|    | Ala Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ser Gln   |      |
|    | 145 150 155                                                       |      |
| 20 | ttc ggc ggc ctc ccc ggc gcc cag tac ggc ggc atc agc gac cgc agc   | 1418 |
|    | Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Asp Arg Ser   |      |
|    | 160 165 170                                                       |      |
|    | cag tgc tcg tcc ttc ccc gcg ccg ctc cag ccg ggc tgc cag tgg cgc   | 1466 |
|    | Gln Cys Ser Ser Phe Pro Ala Pro Leu Gln Pro Gly Cys Gln Trp Arg   |      |
| 25 | 175 180 185 190                                                   |      |
|    | ttc gac tgg ttc cag aac gcc gac aac ccc acc ttc acc ttc cag cgc   | 1514 |
|    | Phe Asp Trp Phe Gln Asn Ala Asp Asn Pro Thr Phe Thr Phe Gln Arg   |      |
|    | 195 200 205                                                       |      |
|    | gtg cag tgc ccg tcc gag ctc acg tcc cgc acg ggc tgt aag cgc gac   | 1562 |
| 30 | Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asp   |      |
|    | 210 215 220                                                       |      |
|    | gac gac gcc agc tat ccc gtc ttc aac ccg cct agc ggt ggc tcc ccc   | 1610 |

Asp Asp Ala Ser Tyr Pro Val Phe Asn Pro Pro Ser Gly Gly Ser Pro  
 225 230 235  
 agc acc acc agc acc acc acc agc tcc ccg tcc ggt ccc acg ggc aac 1658  
 Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr Ser Ser Pro Ser Gly Pro Thr Gly Asn  
 5 240 245 250  
 cct cct gga ggc ggt ggc tgc act gcc cag aag tgg gcc cag tgc ggc 1706  
 Pro Pro Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gln Lys Trp Ala Gln Cys Gly  
 255 260 265 270  
 ggc act ggc ttc acg ggc tgc acc acc tgc gtc tcg ggc acc acc tgc 1754  
 10 Gly Thr Gly Phe Thr Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys  
 275 280 285  
 cag gtg cag aac cag tgg tat tcc cag tgt ctg tgagcgggag gggtgttggg 1807  
 Gln Val Gln Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 290 295  
 15 gtccgtttcc ctagggtga ggctgacgtg aactgggtcc tcttgccgc cccatcacgg 1867  
 gtccgtattc gcgcgcttag ggagaggagg atgcagtttg agggggccac attttgaggg 1927  
 ggacgcagtc tggggtcgaa gcttgctcgg tagggctgcc gtgacgtggt agagcagatg 1987  
 ggaccaagtg cggagctagg cagggtgggtg gttgtggtgg tggcttacct tctgtaacgc 2047  
 aatggcatct catctcactc gctgctccc tgattggtgg ctctgttcgg cctggcgctt 2107  
 20 tttgggaccg ctggctggaa tggattgctc cggaacgcca ggttgagctg ggctggcgcg 2167  
 agtagattgg ccgctccgag ctgcaaccat aataaaattt tcggaccctg taagccgcac 2227  
 ccgaccaggt ctccattggc ggacatgcac gacgtccttc gcaggcacgg cctgccccgc 2287  
 tctgatcacc cgcagttttc gtaccgtcag accagataca agccccg 2334  
 <210> 12  
 25 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Acremonium thermophilum  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (13)..(13)  
 <223> N = unidentified  
 <400> 12

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

Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Gln Lys Trp Ala Gln Cys Gly Gly Thr

260

265

270

Gly Phe Thr Gly Cys Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val

275

280

285

5 Gln Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu

290

295

<210> 13

<211> 2033

<212> DNA

10 <213> Acremonium thermophilum

<220>

<221> CDS

<222> (259)..(702)

<223>

15 <220>

<221> Intron

<222> (703)..(857)

<223>

<220>

20 <221> CDS

<222> (858)..(888)

<223>

<220>

<221> Intron

25 <222> (889)..(990)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (991)..(1268)

30 <223>

<400> 13

ctcgaggaga ggaaccgagt ttgaaagatg ctatatatcg atagactacc ggcgtcgctt

60

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
|    | cgccctgtcc gctctcttgc attccccctg ttgatgagac gagacaaaat tcttggttag | 120 |
|    | aaaagatccg tcgccgagat ttcaccagtg gtaagtcccg agaattggtc attcgacgtt | 180 |
|    | caatatgagt gtcaaagcta tgggtcctaa caaagaagga agcaagagct ttaaagagac | 240 |
|    | agaataacag cagcaaag atg cgt ctc cca cta ccg act ctg ctc gcc ctc   | 291 |
| 5  | Met Arg Leu Pro Leu Pro Thr Leu Leu Ala Leu                       |     |
|    | 1 5 10                                                            |     |
|    | ttg ccc tac tac ctc gaa gtg tcc gct cag ggg gca tcc gga acc ggc   | 339 |
|    | Leu Pro Tyr Tyr Leu Glu Val Ser Ala Gln Gly Ala Ser Gly Thr Gly   |     |
|    | 15 20 25                                                          |     |
| 10 | acg aca aca cgt tac tgg gat tgc tgc aag ccg agc tgc gcg tgg cct   | 387 |
|    | Thr Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro   |     |
|    | 30 35 40                                                          |     |
|    | ctg aag ggc aat tcg ccc agc ccg gtg cag act tgc gac aag aat gac   | 435 |
|    | Leu Lys Gly Asn Ser Pro Ser Pro Val Gln Thr Cys Asp Lys Asn Asp   |     |
| 15 | 45 50 55                                                          |     |
|    | agg ccg ctg aac gat ggg gga aac acc aag tcc ggc tgc gac aac ggt   | 483 |
|    | Arg Pro Leu Asn Asp Gly Gly Asn Thr Lys Ser Gly Cys Asp Asn Gly   |     |
|    | 60 65 70 75                                                       |     |
|    | ggc ggg gcc ttc atg tgc tca tcc cag agt ccc tgg gcc gtc aat gag   | 531 |
| 20 | Gly Gly Ala Phe Met Cys Ser Ser Gln Ser Pro Trp Ala Val Asn Glu   |     |
|    | 80 85 90                                                          |     |
|    | acc acc agc tac ggc tgg gca gcc gtt cgt atc gcc ggc agt acc gag   | 579 |
|    | Thr Thr Ser Tyr Gly Trp Ala Ala Val Arg Ile Ala Gly Ser Thr Glu   |     |
|    | 95 100 105                                                        |     |
| 25 | tcg gcc tgg tgc tgt gcc tgc tac gag ctc acc ttc acc agt ggg ccc   | 627 |
|    | Ser Ala Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro   |     |
|    | 110 115 120                                                       |     |
|    | gtc agt gga aag aag ctc ata gtc cag gcc acg aac act ggt gga gac   | 675 |
|    | Val Ser Gly Lys Lys Leu Ile Val Gln Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp   |     |
| 30 | 125 130 135                                                       |     |
|    | ctt ggg agc aac cac ttt gac ctt gcg gtatgtgggg tttttctttc         | 722 |

|                                                                     |                 |      |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------|------|-----|
| Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Ala                                 |                 |      |     |
| 140                                                                 | 145             |      |     |
| ttcatcatcg ctctcaccat ggattcctcg gcgcaaggac caagattgag aagcgtcaat   |                 | 782  |     |
| gccgggttgg acacgggagc cgggatagga acacagaggc cgtttaagac cgtcagctga   |                 | 842  |     |
| 5 cagcagagca attag att ccc gga ggt ggt gtt ggt cag tcc aat g        |                 | 888  |     |
| Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Gln Ser Asn                             |                 |      |     |
| 150                                                                 | 155             |      |     |
| gtaggttctt tccctgaagt accggcaaca gcctgtgcgt tgctgtatac cccctttaat   |                 | 948  |     |
| catagcatct tccctgctga tacaagccaa cccattttct ag ct tgc acg aac       |                 | 1001 |     |
| 10                                                                  | Ala Cys Thr Asn |      |     |
|                                                                     | 160             |      |     |
| cag tat ggt gcg ccc ccg aac ggc tgg ggc gac agg tat ggt ggc gtg     |                 | 1049 |     |
| Gln Tyr Gly Ala Pro Pro Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly Gly Val     |                 |      |     |
| 165                                                                 | 170             | 175  |     |
| 15 cac tcg cgg agc gac tgc gac agc ttc ccc gcg gcg ctc aag gcc ggc  |                 | 1097 |     |
| His Ser Arg Ser Asp Cys Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys Ala Gly     |                 |      |     |
| 180                                                                 | 185             | 190  |     |
| tgc tac tgg cga ttc gac tgg ttc cag ggc gcc gac aac ccg tcc gtg     |                 | 1145 |     |
| Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Gly Ala Asp Asn Pro Ser Val     |                 |      |     |
| 20 195                                                              | 200             | 205  | 210 |
| agc ttc aaa cag gta gcc tgc ccg gca gcc atc aca gct aag agc ggc     |                 | 1193 |     |
| Ser Phe Lys Gln Val Ala Cys Pro Ala Ala Ile Thr Ala Lys Ser Gly     |                 |      |     |
| 215                                                                 | 220             | 225  |     |
| tgt act cgc cag aac gat gcc atc aac gag act ccg act ggg ccc agc     |                 | 1241 |     |
| 25 Cys Thr Arg Gln Asn Asp Ala Ile Asn Glu Thr Pro Thr Gly Pro Ser  |                 |      |     |
| 230                                                                 | 235             | 240  |     |
| act gtg cct acc tac acc gcg tca ggc tgaaagtcgg ctggggcacc           |                 | 1288 |     |
| Thr Val Pro Thr Tyr Thr Ala Ser Gly                                 |                 |      |     |
| 245                                                                 | 250             |      |     |
| 30 attgcccagg tgatggttgg gcatgtgtta gtctcactca ccaggacat ttgtcgcgac |                 | 1348 |     |
| ctgatcatag gcgccagggg agttgaaagg ggttgccgta cgagaagaca ttttgcgcc    |                 | 1408 |     |
| gtcttactcc cagccacttc tgtacatatt caatgacatt acatagcccg caaatatgtt   |                 | 1468 |     |

catatatcgt ggccgcccac accgccccgg tttgcttagg ctggagctga agtggctcgc 1528  
 cgatggctgt caaaggcagt cggaatatcc ctggttgctt cggcaacacg gtagctgctt 1588  
 gaaccgtacc cagcattaga acaccccccg ccgagggctt gctacgtcaa tggcggggtc 1648  
 tccaacccct gcgcggcaca aaaccaacca cgccctcgtc ttttatgatg tctcgtca 1708  
 5 aacgtcccggt gacgacactc cgctcatggg ctggctctct gatgtagaag gggtaggtca 1768  
 gccgatggtc gtcaccgtcg tcaatgcttc cctcaagctt cttgcggcct ttatcctcca 1828  
 actcttccca catgagaact ccattcttcc gccttttcac aaagccactg cctccttgt 1888  
 caagggccaa aaaccaacgc cgctgatgaa tgcttccgat cgtgtttgac gcgcccgggg 1948  
 tatgcatttg gttcggcgca cttttttcgt cctccagctc ccttaactcc cgttccatct 2008  
 10 gagaggggtga ctgctctact cgact 2033  
 <210> 14  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Acremonium thermophilum  
 15 <400> 14  
 Met Arg Leu Pro Leu Pro Thr Leu Leu Ala Leu Leu Pro Tyr Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Val Ser Ala Gln Gly Ala Ser Gly Thr Gly Thr Thr Thr Arg Tyr  
 20 25 30  
 20 Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp Pro Leu Lys Gly Asn Ser  
 35 40 45  
 Pro Ser Pro Val Gln Thr Cys Asp Lys Asn Asp Arg Pro Leu Asn Asp  
 50 55 60  
 Gly Gly Asn Thr Lys Ser Gly Cys Asp Asn Gly Gly Gly Ala Phe Met  
 25 65 70 75 80  
 Cys Ser Ser Gln Ser Pro Trp Ala Val Asn Glu Thr Thr Ser Tyr Gly  
 85 90 95  
 Trp Ala Ala Val Arg Ile Ala Gly Ser Thr Glu Ser Ala Trp Cys Cys  
 100 105 110  
 30 Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ser Gly Lys Lys  
 115 120 125

Leu Ile Val Gln Ala Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His  
 130 135 140  
 Phe Asp Leu Ala Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Gln Ser Asn Ala Cys  
 145 150 155 160  
 5 Thr Asn Gln Tyr Gly Ala Pro Pro Asn Gly Trp Gly Asp Arg Tyr Gly  
 165 170 175  
 Gly Val His Ser Arg Ser Asp Cys Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys  
 180 185 190  
 Ala Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp Trp Phe Gln Gly Ala Asp Asn Pro  
 10 195 200 205  
 Ser Val Ser Phe Lys Gln Val Ala Cys Pro Ala Ala Ile Thr Ala Lys  
 210 215 220  
 Ser Gly Cys Thr Arg Gln Asn Asp Ala Ile Asn Glu Thr Pro Thr Gly  
 225 230 235 240  
 15 Pro Ser Thr Val Pro Thr Tyr Thr Ala Ser Gly  
 245 250  
 <210> 15  
 <211> 2800  
 <212> DNA  
 20 <213> Chaetomium thermophilum  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2786)..(2786)  
 <223> N = not identified  
 25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (768)..(2042)  
 <223>  
 <400> 15  
 30 ggatccaaga ccgatcccga ggattctcgg attatgtttg catctcaccc tccgaaaccg 60  
 catgaaaaat tgaaatgggc aactgtcgct gtgtttaatg ctttgcacat catgggatca 120  
 tgttcaccgc ctctaattct tcatcctcca gatcctatct atcctccgca tctagccggc 180

|    |                                                                 |            |            |            |             |             |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
|    | ttcttgcttg                                                      | tgatccaaag | ccctgatccc | acgcggcttc | tagacgcttt  | agaaattaca  | 240  |
|    | ccgaatctcc                                                      | ccatgccctt | cttgcaatat | cttcccgacc | aggaacttcg  | ggtgctcaac  | 300  |
|    | atccgcgagc                                                      | ttgacgacga | cccttcttgg | ccggcttggc | atgcgactct  | gttcgggact  | 360  |
|    | caatgcaact                                                      | ctgggccctt | caatgccgcg | catgaccggt | actgaggctt  | agccgcccc   | 420  |
| 5  | atcgcttggc                                                      | acggtacctt | gcagacggaa | tcccgggccc | gttgctccgat | ctgctttggt  | 480  |
|    | tccggtagag                                                      | aagcctcgga | ggaagagaca | cacggacaca | acgattgcg   | gccccaatgc  | 540  |
|    | gctgctccta                                                      | attgaggctc | cgaggctgtg | tgccgtgtgg | agaggccg    | actgggtctg  | 600  |
|    | gggtgcggag                                                      | gattgcggag | atgaagataa | tctgggtgca | accgtggata  | cataaaagg   | 660  |
|    | agtagttctc                                                      | ccctctgtga | aaccttcttc | cccaggattc | tcctcgctc   | taagagtcca  | 720  |
| 10 | aagtcattca                                                      | agacatccta | cagcgggggc | agtgagattc | cataatc     | atg act cgc | 776  |
|    |                                                                 |            |            |            | Met Thr Arg |             |      |
|    |                                                                 |            |            |            | 1           |             |      |
|    | aag ttc gca ctc gtt ccc ctc ctt ctg ggt ctt gcc tcg gcc cag aaa |            |            |            |             |             | 824  |
|    | Lys Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ser Ala Gln Lys |            |            |            |             |             |      |
| 15 | 5                                                               | 10         | 15         |            |             |             |      |
|    | ccc ggc aac act cca gaa gtc cac ccc aag atc acc act tac cgc tgc |            |            |            |             |             | 872  |
|    | Pro Gly Asn Thr Pro Glu Val His Pro Lys Ile Thr Thr Tyr Arg Cys |            |            |            |             |             |      |
|    | 20                                                              | 25         | 30         | 35         |             |             |      |
|    | agc cac cgc cag gga tgc cgc ccg gag acg aac tac atc gtc ctc gac |            |            |            |             |             | 920  |
| 20 | Ser His Arg Gln Gly Cys Arg Pro Glu Thr Asn Tyr Ile Val Leu Asp |            |            |            |             |             |      |
|    | 40                                                              | 45         | 50         |            |             |             |      |
|    | tcc ctc acc cat ccc gtg cac cag ttg aac tcc aac gcg aac tgc ggc |            |            |            |             |             | 968  |
|    | Ser Leu Thr His Pro Val His Gln Leu Asn Ser Asn Ala Asn Cys Gly |            |            |            |             |             |      |
|    | 55                                                              | 60         | 65         |            |             |             |      |
| 25 | gac tgg ggt aac ccg ccc ccg cgc agc gtc tgc cct gat gtc gag acc |            |            |            |             |             | 1016 |
|    | Asp Trp Gly Asn Pro Pro Pro Arg Ser Val Cys Pro Asp Val Glu Thr |            |            |            |             |             |      |
|    | 70                                                              | 75         | 80         |            |             |             |      |
|    | tgc gcg cag aat tgc atc atg gag ggc atc caa gac tac tcc acc tac |            |            |            |             |             | 1064 |
|    | Cys Ala Gln Asn Cys Ile Met Glu Gly Ile Gln Asp Tyr Ser Thr Tyr |            |            |            |             |             |      |
| 30 | 85                                                              | 90         | 95         |            |             |             |      |
|    | ggc gtg acc acc tct ggc tct tcc ctt cgc ctg aag cag atc cac cag |            |            |            |             |             | 1112 |

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|    | Gly | Val | Thr | Thr | Ser | Gly | Ser | Ser | Leu | Arg | Leu | Lys | Gln | Ile | His | Gln |      |
|    | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |      |
|    | ggc | cgc | gtc | acc | tct | cct | cgt | gtc | tac | ctc | ctc | gac | aag | acg | gag | cag | 1160 |
|    | Gly | Arg | Val | Thr | Ser | Pro | Arg | Val | Tyr | Leu | Leu | Asp | Lys | Thr | Glu | Gln |      |
| 5  |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     | 130 |      |
|    | cag | tat | gag | atg | atg | cgt | ctc | acc | ggc | ttc | gag | ttc | act | ttc | gac | gtc | 1208 |
|    | Gln | Tyr | Glu | Met | Met | Arg | Leu | Thr | Gly | Phe | Glu | Phe | Thr | Phe | Asp | Val |      |
|    |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     | 145 |     |      |
|    | gac | acc | acc | aag | ctc | ccc | tgc | ggc | atg | aac | gct | gcg | ctc | tat | ctc | tcc | 1256 |
| 10 | Asp | Thr | Thr | Lys | Leu | Pro | Cys | Gly | Met | Asn | Ala | Ala | Leu | Tyr | Leu | Ser |      |
|    |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |      |
|    | gag | atg | gac | gct | acc | ggc | gct | cgc | tcc | cgc | ctc | aac | cct | ggc | ggt | gcc | 1304 |
|    | Glu | Met | Asp | Ala | Thr | Gly | Ala | Arg | Ser | Arg | Leu | Asn | Pro | Gly | Gly | Ala |      |
|    |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |      |
| 15 | tac | tac | ggc | acg | ggt | tac | tgc | gat | gca | cag | tgc | ttc | gtc | acc | ccc | ttc | 1352 |
|    | Tyr | Tyr | Gly | Thr | Gly | Tyr | Cys | Asp | Ala | Gln | Cys | Phe | Val | Thr | Pro | Phe |      |
|    | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |     |      |
|    | atc | aat | ggc | atc | ggc | aac | atc | gag | ggc | aag | ggc | tcg | tgc | tgc | aac | gag | 1400 |
|    | Ile | Asn | Gly | Ile | Gly | Asn | Ile | Glu | Gly | Lys | Gly | Ser | Cys | Cys | Asn | Glu |      |
| 20 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     | 210 |     |      |
|    | atg | gac | att | tgg | gag | gcc | aac | tcg | cgt | agt | cag | tcc | att | gct | ccg | cac | 1448 |
|    | Met | Asp | Ile | Trp | Glu | Ala | Asn | Ser | Arg | Ser | Gln | Ser | Ile | Ala | Pro | His |      |
|    |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     | 225 |     |     |      |
|    | ccc | tgc | aac | aag | cag | ggt | ctg | tac | atg | tgc | tcc | ggc | cag | gag | tgc | gag | 1496 |
| 25 | Pro | Cys | Asn | Lys | Gln | Gly | Leu | Tyr | Met | Cys | Ser | Gly | Gln | Glu | Cys | Glu |      |
|    |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |     |      |
|    | ttc | gac | ggc | gtc | tgc | gac | gag | tgg | gga | tgc | aca | tgg | aac | ccg | tac | aag | 1544 |
|    | Phe | Asp | Gly | Val | Cys | Asp | Glu | Trp | Gly | Cys | Thr | Trp | Asn | Pro | Tyr | Lys |      |
|    |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |     |     |     |      |
| 30 | gtc | aac | gtt | acc | gac | tac | tat | ggc | cgc | ggt | ccg | cag | ttc | aag | gtc | gac | 1592 |
|    | Val | Asn | Val | Thr | Asp | Tyr | Tyr | Gly | Arg | Gly | Pro | Gln | Phe | Lys | Val | Asp |      |
|    | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |     | 275 |     |      |

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | acg acc cgt ccc ttc acc gtc atc aca cag ttt cca gcc gac cag aac    | 1640 |
|    | Thr Thr Arg Pro Phe Thr Val Ile Thr Gln Phe Pro Ala Asp Gln Asn    |      |
|    | 280 285 290                                                        |      |
|    | ggc aag ctg acg tcg atc cat cgc atg tat gtg caa gat ggc aag ttg    | 1688 |
| 5  | Gly Lys Leu Thr Ser Ile His Arg Met Tyr Val Gln Asp Gly Lys Leu    |      |
|    | 295 300 305                                                        |      |
|    | atc gag gcg cat acc gtc aac ctg ccg ggt tat cct caa gtg aac gcg    | 1736 |
|    | Ile Glu Ala His Thr Val Asn Leu Pro Gly Tyr Pro Gln Val Asn Ala    |      |
|    | 310 315 320                                                        |      |
| 10 | ctg aac gat gac ttc tgc cgt gcc acg gga gcc gcg acg aag tat ctt    | 1784 |
|    | Leu Asn Asp Asp Phe Cys Arg Ala Thr Gly Ala Ala Thr Lys Tyr Leu    |      |
|    | 325 330 335                                                        |      |
|    | gaa ctg ggt gcc act gcg ggt atg ggc gag gct ctg agg cgt ggt atg    | 1832 |
|    | Glu Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Gly Glu Ala Leu Arg Arg Gly Met    |      |
| 15 | 340 345 350 355                                                    |      |
|    | gtg ctg gct atg agc atc tgg tgg gat gag agc ggc ttc atg aac tgg    | 1880 |
|    | Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe Met Asn Trp    |      |
|    | 360 365 370                                                        |      |
|    | ctt gat agc ggc gag tct ggg ccg tgc aac ccg aac gag ggt aac cca    | 1928 |
| 20 | Leu Asp Ser Gly Glu Ser Gly Pro Cys Asn Pro Asn Glu Gly Asn Pro    |      |
|    | 375 380 385                                                        |      |
|    | cag aac att cgc cag att gag ccc gag ccg gag gtt acc tat agc aac    | 1976 |
|    | Gln Asn Ile Arg Gln Ile Glu Pro Glu Pro Glu Val Thr Tyr Ser Asn    |      |
|    | 390 395 400                                                        |      |
| 25 | ctg cgc tgg ggt gag att ggg tcg act tat aag cac aat ctg aag ggc    | 2024 |
|    | Leu Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser Thr Tyr Lys His Asn Leu Lys Gly    |      |
|    | 405 410 415                                                        |      |
|    | ggg tgg act ggc agg aac taagtgttg ggattagagc ctgtgattgg            | 2072 |
|    | Gly Trp Thr Gly Arg Asn                                            |      |
| 30 | 420 425                                                            |      |
|    | atacctgtgg gttaaaccggg gctcggtttg agaggggttg tgaaatttat ttctcgtaca | 2132 |
|    | tagttggcgt cttggcgaat atatgcccc aggactttga tccagtcttc gtccatttct   | 2192 |

ctgtgactta gttgggtgcaa gtatcattgt tatgtcctgg gtgagacaaa gcaatctctt 2252  
 cagtgggtcat gggtaaataa tctacaggct gtgaatggcg ttgcgtcagc ctcattaact 2312  
 taaacgattg gactccccctt ttctaataca tcgccgttgc cgtgtaactc tcttagatct 2372  
 cttgttgat atggcttcaa ctcgaagtga agaaaaatgg atacggcgac ctctttgtgc 2432  
 5 caattttctt gctgttcttc cggtattgac cctcggcaag acaactatgg ccaatattct 2492  
 gttatagtcg gcagttagtg ttgtgtcgta caagtcgtgc gggagcaata ctcaacagcc 2552  
 gcccttaata tgggtattta cgccaagcag cacttcatta cacggctttg gggggtatat 2612  
 attccgttca actctatccc tcattcgggtg tgattgaacg tctccaacag tgaaagtata 2672  
 agtctgacaa aaatgcccaa ccgccatgcc actgatgac ctgttgagat gctcgtggtc 2732  
 10 tataacatcc tgtctaagtg ttacctcct aatgttagcc ccagttctgc tctncttgc 2792  
 tcgacagc 2800  
 <210> 16  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 15 <213> Chaetomium thermophilum  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2786)... (2786)  
 <223> N = not identified  
 20 <400> 16  
 Met Thr Arg Lys Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Leu Gly Leu Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Lys Pro Gly Asn Thr Pro Glu Val His Pro Lys Ile Thr Thr  
 20 25 30  
 25 Tyr Arg Cys Ser His Arg Gln Gly Cys Arg Pro Glu Thr Asn Tyr Ile  
 35 40 45  
 Val Leu Asp Ser Leu Thr His Pro Val His Gln Leu Asn Ser Asn Ala  
 50 55 60  
 Asn Cys Gly Asp Trp Gly Asn Pro Pro Pro Arg Ser Val Cys Pro Asp  
 30 65 70 75 80  
 Val Glu Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ile Met Glu Gly Ile Gln Asp Tyr  
 85 90 95

Ser Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Arg Leu Lys Gln  
 100 105 110  
 Ile His Gln Gly Arg Val Thr Ser Pro Arg Val Tyr Leu Leu Asp Lys  
 115 120 125  
 5 Thr Glu Gln Gln Tyr Glu Met Met Arg Leu Thr Gly Phe Glu Phe Thr  
 130 135 140  
 Phe Asp Val Asp Thr Thr Lys Leu Pro Cys Gly Met Asn Ala Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu Ser Glu Met Asp Ala Thr Gly Ala Arg Ser Arg Leu Asn Pro  
 10 165 170 175  
 Gly Gly Ala Tyr Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Phe Val  
 180 185 190  
 Thr Pro Phe Ile Asn Gly Ile Gly Asn Ile Glu Gly Lys Gly Ser Cys  
 195 200 205  
 15 Cys Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Arg Ser Gln Ser Ile  
 210 215 220  
 Ala Pro His Pro Cys Asn Lys Gln Gly Leu Tyr Met Cys Ser Gly Gln  
 225 230 235 240  
 Glu Cys Glu Phe Asp Gly Val Cys Asp Glu Trp Gly Cys Thr Trp Asn  
 20 245 250 255  
 Pro Tyr Lys Val Asn Val Thr Asp Tyr Tyr Gly Arg Gly Pro Gln Phe  
 260 265 270  
 Lys Val Asp Thr Thr Arg Pro Phe Thr Val Ile Thr Gln Phe Pro Ala  
 275 280 285  
 25 Asp Gln Asn Gly Lys Leu Thr Ser Ile His Arg Met Tyr Val Gln Asp  
 290 295 300  
 Gly Lys Leu Ile Glu Ala His Thr Val Asn Leu Pro Gly Tyr Pro Gln  
 305 310 315 320  
 Val Asn Ala Leu Asn Asp Asp Phe Cys Arg Ala Thr Gly Ala Ala Thr  
 30 325 330 335  
 Lys Tyr Leu Glu Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Gly Glu Ala Leu Arg  
 340 345 350

Arg Gly Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp Asp Glu Ser Gly Phe

355

360

365

Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Glu Ser Gly Pro Cys Asn Pro Asn Glu

370

375

380

5 Gly Asn Pro Gln Asn Ile Arg Gln Ile Glu Pro Glu Pro Glu Val Thr

385

390

395

400

Tyr Ser Asn Leu Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser Thr Tyr Lys His Asn

405

410

415

Leu Lys Gly Gly Trp Thr Gly Arg Asn

10

420

425

<210> 17

<211> 1943

<212> DNA

<213> *Thermoascus aurantiacus*

15

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(256)

<223>

<220>

20

<221> Intron

<222> (257)..(329)

<223>

<220>

<221> CDS

25

<222> (330)..(370)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (371)..(444)

30

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (445) .. (493)  
<223>  
<220>  
<221> intron  
5 <222> (494) .. (561)  
<223>  
<220>  
<221> CDS  
<222> (562) .. (683)  
10 <223>  
<220>  
<221> intron  
<222> (684) .. (786)  
<223>  
15 <220>  
<221> CDS  
<222> (787) .. (932)  
<223>  
<220>  
20 <221> intron  
<222> (933) .. (1001)  
<223>  
<220>  
<221> CDS  
25 <222> (1002) .. (1090)  
<223>  
<220>  
<221> intron  
<222> (1091) .. (1155)  
30 <223>  
<220>  
<221> CDS

<222> (1156) .. (1174)  
<223>  
<220>  
<221> Intron  
5 <222> (1175) .. (1267)  
<223>  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1268) .. (1295)  
10 <223>  
<220>  
<221> Intron  
<222> (1296) .. (1361)  
<223>  
15 <220>  
<221> CDS  
<222> (1362) .. (1451)  
<223>  
<220>  
20 <221> Intron  
<222> (1452) .. (1551)  
<223>  
<220>  
<221> CDS  
25 <222> (1552) .. (1617)  
<223>  
<220>  
<221> Intron  
<222> (1618) .. (1829)  
30 <223>  
<220>  
<221> CDS

&lt;222&gt; (1830)..(1922)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 17

5

ccgcgggaag cc atg gtt cga cca acg atc cta ctt act tca ctc ctg cta 51

Met Val Arg Pro Thr Ile Leu Leu Thr Ser Leu Leu Leu

1 5 10

gct ccc ttc gca gct gcg agc cct atc ctc gag gaa cgc caa gct gca 99

Ala Pro Phe Ala Ala Ala Ser Pro Ile Leu Glu Glu Arg Gln Ala Ala

15 20 25

10

cag agt gtc gac caa ctg atc aag gct cgc ggc aag gtg tac ttt ggc 147

Gln Ser Val Asp Gln Leu Ile Lys Ala Arg Gly Lys Val Tyr Phe Gly

30 35 40 45

gtc gcc acg gac caa aac cgg ctg acg acc ggc aag aat gcg gct atc 195

Val Ala Thr Asp Gln Asn Arg Leu Thr Thr Gly Lys Asn Ala Ala Ile

15

50 55 60

atc cag gct gat ttc ggc cag gtc acg ccg gag aat agt atg aaa tgg 243

Ile Gln Ala Asp Phe Gly Gln Val Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp

65 70 75

gac gct act gaa c gtgcgtgaga aagataattt gatttttttc ttctatgacc 296

20

Asp Ala Thr Glu

80

gctcggaaccg ttctgactag gtttataata tag ct tct caa gga aac ttc aac 349

Pro Ser Gln Gly Asn Phe Asn

85

25

ttt gcc ggt gct gat tac ctt gtacgtacat acgaccactt gacgtttctt 400

Phe Ala Gly Ala Asp Tyr Leu

90 95

gcacgcaact gcgattgagg agaagataact aatcttcttg aaag gtc aat tgg gcc 456

Val Asn Trp Ala

30

cag caa aat gga aag ctg atc cgt ggc cat act ctt g gtttagtagaa 503

Gln Gln Asn Gly Lys Leu Ile Arg Gly His Thr Leu  
 100 105 110  
 cgccaacctg cttccctaac ttactgaaga aggaaaaccg aattgaccgt cccccaag 561  
 ta tgg cac tgg cag ctg ccc tgg tgg gtc agc tcc atc acc gac aag 608  
 5 Val Trp His Ser Gln Leu Pro Ser Trp Val Ser Ser Ile Thr Asp Lys  
 115 120 125  
 aat acg ctg acc aac gtg atg aaa aat cac atc acc acc ttg atg acc 656  
 Asn Thr Leu Thr Asn Val Met Lys Asn His Ile Thr Thr Leu Met Thr  
 130 135 140  
 10 cgg tac aag ggc aag atc cgt gca tgg gtcagtcac caccctaag 703  
 Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Arg Ala Trp  
 145 150  
 ctgcgtttca atgaagagac aaataagaac acacgtatct gcccgggcgt ttcagaatca 763  
 gaactgacag aatcactgaa tag gac gtg gtg aac gag gca ttc aac gag gat 816  
 15 Asp Val Val Asn Glu Ala Phe Asn Glu Asp  
 155 160  
 ggc tcc ctc cgc cag act gtc ttc ctc aac gtc atc ggg gag gat tac 864  
 Gly Ser Leu Arg Gln Thr Val Phe Leu Asn Val Ile Gly Glu Asp Tyr  
 165 170 175  
 20 atc ccg att gct ttc cag acc gcc cgc gcc gct gac ccg aat gcc aag 912  
 Ile Pro Ile Ala Phe Gln Thr Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys  
 180 185 190  
 ctg tac atc aac gat tac aa gtaagattta aggctcagtg atattccatt 962  
 Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn  
 25 195 200  
 tagtgtgaga agcattgctt atgagcatct gtattacag c ctc gac agt gcc tgg 1017  
 Leu Asp Ser Ala Ser  
 205  
 tac ccc aag acg cag gcc att gtc aac cgc gtc aag caa tgg cgt gca 1065  
 30 Tyr Pro Lys Thr Gln Ala Ile Val Asn Arg Val Lys Gln Trp Arg Ala  
 210 215 220  
 gct gga gtc ccg att gac ggc ata g gtatgtctct ctttctgttt 1110

Ala Gly Val Pro Ile Asp Gly Ile  
 225 230  
 gtgatgtgac cgatttgaaa ccagtctaac gttagctggg tctag ga tcg caa acg 1166  
 Gly Ser Gln Thr  
 5 cac ctc ag gtaaataatc ggggaatgcct cggagaataa aagagaaaaa 1214  
 His Leu Ser  
 235  
 aaatgattgt cttatcagat cgtatcgact gactcatggc ttgtccaaaa tag c gct 1271  
 Ala  
 10 ggt cag gga gcc ggt gtt cta caa taagtgcgcc cctcccctat tttttactat 1325  
 Gly Gln Gly Ala Gly Val Leu Gln  
 240 245  
 tattgcgaga gcggaatagg ctgacaaccc caaacg gct ctt ccg ctc ctt gct 1379  
 Ala Leu Pro Leu Leu Ala  
 15 250  
 agt gcc gga act ccc gag gtc gct atc acg gaa ctg gac gtg gct ggt 1427  
 Ser Ala Gly Thr Pro Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Val Ala Gly  
 255 260 265  
 gct agc ccg acg gat tac gtc aat gtatgtacct cgttgtccct atcccccttg 1481  
 20 Ala Ser Pro Thr Asp Tyr Val Asn  
 270 275  
 gatactttgt ataattatta tcttcccgga gcctgttgat cagatctgac gatcatttct 1541  
 cgttttttag gtc gtg aao gct tgc ctc aac gtg cag tcc tgc gtg ggc 1590  
 Val Val Asn Ala Cys Leu Asn Val Gln Ser Cys Val Gly  
 25 280 285  
 atc acc gtc tgg ggc gtg gca gat ccg gtaagcgagg ttcttccgta 1637  
 Ile Thr Val Trp Gly Val Ala Asp Pro  
 290 295  
 ctccgtaccc aactagagtt cgggctgtca cgatcatgtct tagtcgtctt cagtcaggcc 1697  
 30 aaggccaaga cacaggacct gaaacgggca ggcagcagct gctagcagcc caagaagcag 1757  
 ccacatgatg catgattatt attattatat ctccgagttc tgggctaacg attggtgata 1817  
 ataaataaat ag gac tca tgg cgt gct agc acg acg cct ctc ctc ttc gac 1868

Asp Ser Trp Arg Ala Ser Thr Thr Pro Leu Leu Phe Asp  
 300 305 310  
 ggc aac ttc aac ccg aag ccg gcg tac aac gcc att gtg cag gac ctg 1916  
 Gly Asn Phe Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Asn Ala Ile Val Gln Asp Leu  
 5 315 320 325  
 cag cag tgagtataga ccggtggatc c 1943  
 Gln Gln  
 <210> 18  
 <211> 329  
 10 <212> PRT  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*  
 <400> 18  
 Met Val Arg Pro Thr Ile Leu Leu Thr Ser Leu Leu Leu Ala Pro Phe  
 1 5 10 15  
 15 Ala Ala Ala Ser Pro Ile Leu Glu Glu Arg Gln Ala Ala Gln Ser Val  
 20 25 30  
 Asp Gln Leu Ile Lys Ala Arg Gly Lys Val Tyr Phe Gly Val Ala Thr  
 35 40 45  
 Asp Gln Asn Arg Leu Thr Thr Gly Lys Asn Ala Ala Ile Ile Gln Ala  
 20 50 55 60  
 Asp Phe Gly Gln Val Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Glu Pro Ser Gln Gly Asn Phe Asn Phe Ala Gly Ala Asp Tyr Leu Val  
 85 90 95  
 25 Asn Trp Ala Gln Gln Asn Gly Lys Leu Ile Arg Gly His Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Trp His Ser Gln Leu Pro Ser Trp Val Ser Ser Ile Thr Asp Lys Asn  
 115 120 125  
 Thr Leu Thr Asn Val Met Lys Asn His Ile Thr Thr Leu Met Thr Arg  
 30 130 135 140  
 Tyr Lys Gly Lys Ile Arg Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Phe Asn  
 145 150 155 160

Glu Asp Gly Ser Leu Arg Gln Thr Val Phe Leu Asn Val Ile Gly Glu  
                             165                            170                            175  
 Asp Tyr Ile Pro Ile Ala Phe Gln Thr Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asn  
                             180                            185                            190  
 5 Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Leu Asp Ser Ala Ser Tyr Pro  
                             195                            200                            205  
 Lys Thr Gln Ala Ile Val Asn Arg Val Lys Gln Trp Arg Ala Ala Gly  
                             210                            215                            220  
 Val Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Ser Ala Gly Gln  
 10 225                            230                            235                            240  
 Gly Ala Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Leu Leu Ala Ser Ala Gly Thr  
                             245                            250                            255  
 Pro Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Val Ala Gly Ala Ser Pro Thr  
                             260                            265                            270  
 15 Asp Tyr Val Asn Val Val Asn Ala Cys Leu Asn Val Gln Ser Cys Val  
                             275                            280                            285  
 Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ala Asp Pro Asp Ser Trp Arg Ala Ser  
                             290                            295                            300  
 Thr Thr Pro Leu Leu Phe Asp Gly Asn Phe Asn Pro Lys Pro Ala Tyr  
 20 305                            310                            315                            320  
 Asn Ala Ile Val Gln Asp Leu Gln Gln  
                             325  
  
 <210> 19  
 <211> 2955  
 25 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1335)..(1671)  
 30 <223>  
 <220>  
 <221> Intron

<222> (1672)..(1806)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 5 <222> (1807)..(2032)  
 <223>  
 <220>  
 <221> Intron  
 <222> (2033)..(2117)  
 10 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2118)..(2802)  
 <223>  
 15 <400> 19  
 tctagagctg tcgacgcggc cgcgtaatac gactcactat agggcgaaga attcggatca 60  
 cgtttgcttc agcaagtcgt tcgctacgac accacgtcca tgatggaggc cctgattcaa 120  
 tcataccaag gacggggcat gatggctgat ggctggactc gaagtgagtg gcccgaggct 180  
 gaattttcct tcccgttctc tacagtcctt cctcagcga cacatccgca gttttgacag 240  
 20 cggaaatcgt caggatgctc cgccttctct cgcaacctga gtgccaggc gtctcggcca 300  
 cegtctctta tatatggcgc ctgggtccgc ctttcgatcg gttttcgatt tggctctctc 360  
 tagttccctc agctgaccgc ggatatcgct tgtggctccg aaacctcacc atcccagacg 420  
 agcaagttct ccgcagtcca cctcagctca tccggccctt ggtagcatcg cagcgacccc 480  
 agacgaaggc accaaagaag catactatat attaggctaa atcgagcccc acgtggaata 540  
 25 tttgccatcg aggaggggtg gttgggcttc ttgtcctcgc aggtgctgcg cctgtacct 600  
 cctggtgctc cagctggtgc tcccgctggt gctgttcag tcgcgctctg gcccgaatgc 660  
 tctgtatctc ggttcgtccc gcactccttt cgccaagcgc taccaatgct ttgacgaacc 720  
 cggtaaattt gcagtggacc tgcagctggg caaacccgca gtgggaacca cagacctggt 780  
 tcgttcgaca cactccaatc gcaacccgc ccgcgcaaac cttgcaccac atgtcgcccc 840  
 30 tttcccagtt gggtcctga agacacggag ccaattccgt gatcgctggc tcccgaagcc 900  
 gacagtcgga cgctgcaata ggatgccagc acccgtagat ccaagggcca gtgaccccaa 960  
 ctctttcgcg gtattctggc cctcccaaag gtatgccagg acttcctgt ctttgctacc 1020

|    |                                                                   |      |
|----|-------------------------------------------------------------------|------|
|    | accagctctc ctccacggcg gaacggatac gccgtctcgc cggctcttgc tcgacaacat | 1080 |
|    | gcgagggggc gcgaaggcta ggttgtgacg atgcgacggt gcgatgtcac catttggcag | 1140 |
|    | tgatgttttc cgttgtcccc ttctccaccc tgcgccgttt cctcaaagac gccccaacca | 1200 |
|    | taaatacgat gcgacgcaa ccttcatgtg ttcgtggcat cttgcctgac cagtctcagc  | 1260 |
| 5  | aagaaacctg tggcgggcgcg attgtcttga ccttctgatt gaaaacggat ctgcgtctc | 1320 |
|    | ctcgatagcc gacc atg cgc gcc aag caa ctc ctg gcg gcc ggc ctg ctg   | 1370 |
|    | Met Arg Ala Lys Gln Leu Leu Ala Ala Gly Leu Leu                   |      |
|    | 1 5 10                                                            |      |
|    | gcc ccc gcg tcc gtc tcg gcc cag ctc aac agc ctc gcc gtg gcg gct   | 1418 |
| 10 | Ala Pro Ala Ser Val Ser Ala Gln Leu Asn Ser Leu Ala Val Ala Ala   |      |
|    | 15 20 25                                                          |      |
|    | ggc ctc aag tac ttc ggc acg gcc gtg cgg gag gcc aac gtc aac ggc   | 1466 |
|    | Gly Leu Lys Tyr Phe Gly Thr Ala Val Arg Glu Ala Asn Val Asn Gly   |      |
|    | 30 35 40                                                          |      |
| 15 | gac gcc acc tac atg tcg tac gtc aac aac aag tcc gag ttc ggc cag   | 1514 |
|    | Asp Ala Thr Tyr Met Ser Tyr Val Asn Asn Lys Ser Glu Phe Gly Gln   |      |
|    | 45 50 55 60                                                       |      |
|    | gtg acg ccc gag aac ggc cag aag tgg gat tcc acc gag ccc agc cag   | 1562 |
|    | Val Thr Pro Glu Asn Gly Gln Lys Trp Asp Ser Thr Glu Pro Ser Gln   |      |
| 20 | 65 70 75                                                          |      |
|    | ggc cag ttc agc tac agc cag gcc gac atc gtc ccc gcc gtc gcg aag   | 1610 |
|    | Gly Gln Phe Ser Tyr Ser Gln Gly Asp Ile Val Pro Gly Val Ala Lys   |      |
|    | 80 85 90                                                          |      |
|    | aag aac gcc cag gtg ctg cgc tgc cac acc ctg gtg tgg tac agc cag   | 1658 |
| 25 | Lys Asn Gly Gln Val Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Ser Gln   |      |
|    | 95 100 105                                                        |      |
|    | ctc ccc agc tgg g gtcagtgaact ctctctttct ctctgtcttt ctctttgtct    | 1711 |
|    | Leu Pro Ser Trp                                                   |      |
|    | 110                                                               |      |
| 30 | ttctctcttt ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctccca tccagcatcg | 1771 |
|    | actgctgate ttgctgacca gaagctcgtg tgcag tg tca tcc gga agt tgg     | 1823 |

Val Ser Ser Gly Ser Trp

115

acc cgc gcg acg ctt cag tcc gtc atc gag acg cac atc tcg aac gtg 1871  
 Thr Arg Ala Thr Leu Gln Ser Val Ile Glu Thr His Ile Ser Asn Val  
 5 120 125 130  
 atg ggc cac tac aag ggc cag tgc tac gcc tgg gac gtg gtc aac gag 1919  
 Met Gly His Tyr Lys Gly Gln Cys Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu  
 135 140 145 150  
 gcc atc aac gac gac ggc acg tgg cgg acc agc gtc ttc tac aac acc 1967  
 10 Ala Ile Asn Asp Asp Gly Thr Trp Arg Thr Ser Val Phe Tyr Asn Thr  
 155 160 165  
 ttc aac acc gac tac ctg gcc att gcc ttc aac gcc gcg aag aag gcc 2015  
 Phe Asn Thr Asp Tyr Leu Ala Ile Ala Phe Asn Ala Ala Lys Lys Ala  
 170 175 180  
 15 gat gcg ggc gcg aag ct gtaggtgtcg gcctttacgt tgccgcagcg 2062  
 Asp Ala Gly Ala Lys Leu  
 185  
 cacctccgcg acatgagccc cagagcgcgt ggctaatagt tcttcacgca cgcag g 2118  
 tac tac aac gac tac aat ctc gag tac aac ggc gcc aag acc aac acg 2166  
 20 Tyr Tyr Asn Asp Tyr Asn Leu Glu Tyr Asn Gly Ala Lys Thr Asn Thr  
 190 195 200  
 gcc gtg cag ctg gtg cag atc gtg cag cag gcc ggc gcg ccc atc gac 2214  
 Ala Val Gln Leu Val Gln Ile Val Gln Gln Ala Gly Ala Pro Ile Asp  
 205 210 215 220  
 25 ggg gtg ggc ttc cag ggc cac ctg atc gtg ggg tca acg ccg tcg cgc 2262  
 Gly Val Gly Phe Gln Gly His Leu Ile Val Gly Ser Thr Pro Ser Arg  
 225 230 235  
 agc tcc ctg gcc acg gcg ctg aag cgc ttc acg gcg ctt ggc ctg gag 2310  
 Ser Ser Leu Ala Thr Ala Leu Lys Arg Phe Thr Ala Leu Gly Leu Glu  
 30 240 245 250  
 gtg gcg tac acg gag ctg gac atc cgg cac tcg agc ctg ccg ccg tcg 2358

|    |     |     |     |     |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|----|-----|-----|-----|-----|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
|    | Val | Ala | Tyr | Thr | Glu        | Leu        | Asp        | Ile        | Arg | His | Ser | Ser | Leu | Pro | Pro | Ser |      |  |
|    | 255 |     |     |     | 260        |            |            |            | 265 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|    | tcg | gcg | gcg | ctg | gcg        | acg        | cag        | ggc        | aac | gac | ttc | gcc | agc | gtg | gtg | ggc | 2406 |  |
|    | Ser | Ala | Ala | Leu | Ala        | Thr        | Gln        | Gly        | Asn | Asp | Phe | Ala | Ser | Val | Val | Gly |      |  |
| 5  | 270 |     |     |     | 275        |            |            |            | 280 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|    | tcg | tgc | ctc | gac | gtg        | gcg        | ggc        | tgc        | gtg | ggc | atc | acc | atc | tgg | ggg | ttc | 2454 |  |
|    | Ser | Cys | Leu | Asp | Val        | Ala        | Gly        | Cys        | Val | Gly | Ile | Thr | Ile | Trp | Gly | Phe |      |  |
|    | 285 |     |     |     | 290        |            |            |            | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |      |  |
|    | acg | gac | aag | tac | agc        | tgg        | gtg        | ccc        | gac | acg | ttc | ccc | ggc | tcg | ggc | gcg | 2502 |  |
| 10 | Thr | Asp | Lys | Tyr | Ser        | Trp        | Val        | Pro        | Asp | Thr | Phe | Pro | Gly | Ser | Gly | Ala |      |  |
|    | 305 |     |     |     | 310        |            |            |            | 315 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|    | gcg | ctg | ctg | tac | gac        | gcg        | aac        | tac        | agc | aag | aag | ccg | gcg | tgg | acg | tcg | 2550 |  |
|    | Ala | Leu | Leu | Tyr | Asp        | Ala        | Asn        | Tyr        | Ser | Lys | Lys | Pro | Ala | Trp | Thr | Ser |      |  |
|    | 320 |     |     |     | 325        |            |            |            | 330 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 15 | gtc | tcg | tcg | gtg | ctg        | gcg        | gcc        | aag        | gcg | acg | aac | ccg | ccc | ggc | ggc | ggg | 2598 |  |
|    | Val | Ser | Ser | Val | Leu        | Ala        | Ala        | Lys        | Ala | Thr | Asn | Pro | Pro | Gly | Gly | Gly |      |  |
|    | 335 |     |     |     | 340        |            |            |            | 345 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|    | aac | cca | ccc | ccc | gtc        | acc        | acc        | acg        | acc | acg | acc | acg | acc | acg | tcg | aag | 2646 |  |
|    | Asn | Pro | Pro | Pro | Val        | Thr        | Thr        | Thr        | Thr | Thr | Thr | Thr | Thr | Thr | Ser | Lys |      |  |
| 20 | 350 |     |     |     | 355        |            |            |            | 360 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|    | ccg | tcg | cag | ccc | acc        | acc        | acg        | acc        | acg | acc | acc | agc | ccg | cag | ggc | ccg | 2694 |  |
|    | Pro | Ser | Gln | Pro | Thr        | Thr        | Thr        | Thr        | Thr | Thr | Thr | Ser | Pro | Gln | Gly | Pro |      |  |
|    | 365 |     |     |     | 370        |            |            |            | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |      |  |
|    | cag | cag | acg | cac | tgg        | ggc        | cag        | tgc        | ggc | ggg | atc | ggc | tgg | acg | ggg | ccg | 2742 |  |
| 25 | Gln | Gln | Thr | His | Trp        | Gly        | Gln        | Cys        | Gly | Gly | Ile | Gly | Trp | Thr | Gly | Pro |      |  |
|    | 385 |     |     |     | 390        |            |            |            | 395 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|    | cag | tcg | tgc | cag | agc        | ccg        | tgg        | acg        | tgc | cag | aag | cag | aac | gac | tgg | tac | 2790 |  |
|    | Gln | Ser | Cys | Gln | Ser        | Pro        | Trp        | Thr        | Cys | Gln | Lys | Gln | Asn | Asp | Trp | Tyr |      |  |
|    | 400 |     |     |     | 405        |            |            |            | 410 |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
| 30 | tct | cag | tgc | ctg | tgaccaccac | ggctgaccag | ctgccattcc | gaccacgggg |     |     |     |     |     |     |     |     | 2842 |  |
|    | Ser | Gln | Cys | Leu |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |

cccgactac aaaaagaggg gacggtgtaa ataaagagcc gaacgggtct acgtacactg 2902

ttttgacctt ttctccgcag acgtatatta tcaattatag ttggatttct aga 2955

<210> 20

<211> 416

5 <212> PRT

<213> Acremonium thermophilum

<400> 20

Met Arg Ala Lys Gln Leu Leu Ala Ala Gly Leu Leu Ala Pro Ala Ser

1 5 10 15

10 Val Ser Ala Gln Leu Asn Ser Leu Ala Val Ala Ala Gly Leu Lys Tyr

20 25 30

Phe Gly Thr Ala Val Arg Glu Ala Asn Val Asn Gly Asp Ala Thr Tyr

35 40 45

Met Ser Tyr Val Asn Asn Lys Ser Glu Phe Gly Gln Val Thr Pro Glu

15 50 55 60

Asn Gly Gln Lys Trp Asp Ser Thr Glu Pro Ser Gln Gly Gln Phe Ser

65 70 75 80

Tyr Ser Gln Gly Asp Ile Val Pro Gly Val Ala Lys Lys Asn Gly Gln

85 90 95

20 Val Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Ser Gln Leu Pro Ser Trp

100 105 110

Val Ser Ser Gly Ser Trp Thr Arg Ala Thr Leu Gln Ser Val Ile Glu

115 120 125

Thr His Ile Ser Asn Val Met Gly His Tyr Lys Gly Gln Cys Tyr Ala

25 130 135 140

Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Ile Asn Asp Asp Gly Thr Trp Arg Thr

145 150 155 160

Ser Val Phe Tyr Asn Thr Phe Asn Thr Asp Tyr Leu Ala Ile Ala Phe

165 170 175

30 Asn Ala Ala Lys Lys Ala Asp Ala Gly Ala Lys Leu Tyr Tyr Asn Asp

180 185 190

Tyr Asn Leu Glu Tyr Asn Gly Ala Lys Thr Asn Thr Ala Val Gln Leu  
 195 200 205  
 Val Gln Ile Val Gln Gln Ala Gly Ala Pro Ile Asp Gly Val Gly Phe  
 210 215 220  
 5 Gln Gly His Leu Ile Val Gly Ser Thr Pro Ser Arg Ser Ser Leu Ala  
 225 230 235 240  
 Thr Ala Leu Lys Arg Phe Thr Ala Leu Gly Leu Glu Val Ala Tyr Thr  
 245 250 255  
 Glu Leu Asp Ile Arg His Ser Ser Leu Pro Pro Ser Ser Ala Ala Leu  
 10 260 265 270  
 Ala Thr Gln Gly Asn Asp Phe Ala Ser Val Val Gly Ser Cys Leu Asp  
 275 280 285  
 Val Ala Gly Cys Val Gly Ile Thr Ile Trp Gly Phe Thr Asp Lys Tyr  
 290 295 300  
 15 Ser Trp Val Pro Asp Thr Phe Pro Gly Ser Gly Ala Ala Leu Leu Tyr  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Asn Tyr Ser Lys Lys Pro Ala Trp Thr Ser Val Ser Ser Val  
 325 330 335  
 Leu Ala Ala Lys Ala Thr Asn Pro Pro Gly Gly Gly Asn Pro Pro Pro  
 20 340 345 350  
 Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Lys Pro Ser Gln Pro  
 355 360 365  
 Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Pro Gln Gly Pro Gln Gln Thr His  
 370 375 380  
 25 Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Gln Ser Cys Gln  
 385 390 395 400  
 Ser Pro Trp Thr Cys Gln Lys Gln Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
 405 410 415  
 <210> 21  
 30 <211> 5092  
 <212> DNA  
 <213> Thermoascus aurantiacus

<220>  
<221> CDS  
<222> (669)..(728)  
<223>  
5 <220>  
<221> Intron  
<222> (729)..(872)  
<223>  
<220>  
10 <221> CDS  
<222> (873)..(1015)  
<223>  
<220>  
<221> Intron  
15 <222> (1016)..(1082)  
<223>  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1083)..(1127)  
20 <223>  
<220>  
<221> Intron  
<222> (1128)..(1183)  
<223>  
25 <220>  
<221> CDS  
<222> (1184)..(1236)  
<223>  
<220>  
30 <221> Intron  
<222> (1237)..(1300)  
<223>

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1301)..(1717)  
 <223>  
 5 <220>  
 <221> intron  
 <222> (1718)..(1776)  
 <223>  
 <220>  
 10 <221> CDS  
 <222> (1777)..(2489)  
 <223>  
 <220>  
 <221> intron  
 15 <222> (2490)..(2599)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2600)..(3469)  
 20 <223>  
 <220>  
 <221> intron  
 <222> (3470)..(3531)  
 <223>  
 25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (3532)..(3759)  
 <223>  
 <400> 21  
 30 ggatccgtcc gcggacacag gcagagagac ggcaacgggga ctcgacctga tcctcccagg 60  
 gcgggggtggt gtttgtggcg agggagcgat gctgatgttc ttccagctcc gttgctacct 120  
 tcccacggcc atttagccgg cggacggcat gtaacatgtc aaacatgtgg gctcggcagt 180

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | gggggcgtga gacgcagcac ctgacccggc ggcgcgggcg ttgcagggtc cagggacagc  | 240  |
|    | cggccgtggt cgtttgcggg gaaggcgaca cagacgactt ggcgcgggccc gccggaaggc | 300  |
|    | gaggaatcat gagtgcgacg gagacatggc aagaccacgg ccttctctggc gaagaagaag | 360  |
|    | atgaataatc gcagggggcag tgtggcatgg accgcacggc cgccagggac ctgccccgtg | 420  |
| 5  | aggtttctcg ggtgtttcca ctggttccat cgctgggggc gatccccgagc ccgtgtgccc | 480  |
|    | gtgtaactat tattgacgat caacatgcca tggccagcca gcttctataa taatcatata  | 540  |
|    | taacaccccc cgttctcccg ctgccttget ccgtggtctt cctggtctctg cttgaggttc | 600  |
|    | acgagtctcc ttgcatggtc aactcgtcct ctgcttcac cgtgcttga ctccgtacct    | 660  |
|    | cagcaacc atg agg ctt ggg tgg ctg gag ctg gcc gtc gcg gcg gcc gca   | 710  |
| 10 | Met Arg Leu Gly Trp Leu Glu Leu Ala Val Ala Ala Ala Ala            |      |
|    | 1 5 10                                                             |      |
|    | acc gtc gcc agc gcc aag gtgcgtcaga cccctccccg gatcgacctt           | 758  |
|    | Thr Val Ala Ser Ala Lys                                            |      |
|    | 15 20                                                              |      |
| 15 | taggtgcttc ttcagcaagt gcgcgccggc cgcgacatcc gccgcgctg cctcaccga    | 818  |
|    | cgcagcagccc atatgcagca ggagagaagg catctctgac gaaagctccc ccag gat   | 875  |
|    | Asp                                                                |      |
|    | gac ttg gcc tac tgc ccg cct ttc tac ccg tgc cca tgg atg aac gga    | 923  |
|    | Asp Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro Trp Met Asn Gly    |      |
| 20 | 25 30 35                                                           |      |
|    | aac gga gag tgg gcg gag gcc tac cgc agg gct gtc gac ttc gtc tgc    | 971  |
|    | Asn Gly Glu Trp Ala Glu Ala Tyr Arg Arg Ala Val Asp Phe Val Ser    |      |
|    | 40 45 50                                                           |      |
|    | cag ctg acc ctc gcg gag aag gtc aac ctg acg acc ggt gtc gg         | 1015 |
| 25 | Gln Leu Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Val Gly        |      |
|    | 55 60 65                                                           |      |
|    | gtgagtccat tgacctctac cgagcccccg ttccatgtcc attgagcaat tggctgacgt  | 1075 |
|    | cttgaag c tgg atg cag gag aaa tgt gtc ggt gaa acg ggc agc att ccg  | 1125 |
|    | Trp Met Gln Glu Lys Cys Val Gly Glu Thr Gly Ser Ile Pro            |      |
| 30 | 70 75 80                                                           |      |
|    | ag gtaggctcac ttcccaatgc cgctgcaaag gaggtgtcta aactggaata aatcag   | 1183 |

Arg

a ctg ggg ttc cgt gga ctg tgc ctc caa gac tgc ccc ctt ggt gtc aga 1232

Leu Gly Phe Arg Gly Leu Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu Gly Val Arg

85

90

95

5 ttt g gtaggtcttt caacagagaa caagggtcgt cgcgaggagag atgctgatcg 1286

Phe

100

atacctactt ttag ct gac tac gtt tct gcc ttc ccc gcc ggt gtc aat 1335

Ala Asp Tyr Val Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn

10

105

110

gtc gct gca acg tgg gat aag aac ctc gcc tac ctt cgt ggg aag gcg 1383

Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Asn Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Lys Ala

115

120

125

atg ggt gag gaa cac cgt ggt aag ggc gtc gac gtc cag ctg gga cct 1431

15

Met Gly Glu Glu His Arg Gly Lys Gly Val Asp Val Gln Leu Gly Pro

130

135

140

gtc gcc ggc cct ctt ggc aga cac ccc gac ggt ggc aga aac tgg gag 1479

Val Ala Gly Pro Leu Gly Arg His Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu

145

150

155

160

20 ggt ttc tct cct gac ccc gtc ctg acc ggt gtg ctt atg gcg gag acg 1527

Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Val Leu Met Ala Glu Thr

165

170

175

atc aag ggt atc cag gat gcc ggt gtg att gct tgc gcc aag cac ttc 1575

Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Phe

25

180

185

190

att ggt aac gag atg gag cac ttc cgg caa gcc ggt gag gct gtt ggc 1623

Ile Gly Asn Glu Met Glu His Phe Arg Gln Ala Gly Glu Ala Val Gly

195

200

205

tat ggt ttc gat att acc gag agt gtc agc tca aat atc gac gac aag 1671

30

Tyr Gly Phe Asp Ile Thr Glu Ser Val Ser Ser Asn Ile Asp Asp Lys

210

215

220

acg ctt cac gag ctg tac ctt tgg ccc ttt gcg gat gct gtt cgc g 1717

Thr Leu His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg  
 225 230 235  
 gtaagcagtc cccccctcat aggtgattgt acatgtgtat ttctgactcg ctttcaaag 1776  
 ct ggc gtt ggt tgc ttc atg tgc tcc tac aac cag gtt aac aac agc 1823  
 5 Ala Gly Val Gly Ser Phe Met Cys Ser Tyr Asn Gln Val Asn Asn Ser  
 245 250 255  
 tac agc tgc tgc aac agc tac ctc cta aac aag ttg ctc aaa tgc gag 1871  
 Tyr Ser Cys Ser Asn Ser Tyr Leu Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ser Glu  
 260 265 270  
 10 ctt gat ttt cag ggc ttc gtg atg agt gac tgg gga gcg cac cac agc 1919  
 Leu Asp Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Gly Ala His His Ser  
 275 280 285  
 ggc gtt gga gct gcc ctg gct ggc ctt gac atg tgc atg cca gga gac 1967  
 Gly Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp  
 15 290 295 300  
 acc gcc ttt ggt acc ggc aaa tcc ttc tgg gga acc aac ctg acc atc 2015  
 Thr Ala Phe Gly Thr Gly Lys Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Ile  
 305 310 315  
 gcc gtt ctc aac ggt act gtt ccg gaa tgg cgt gtg gat gac atg gct 2063  
 20 Ala Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Glu Trp Arg Val Asp Asp Met Ala  
 320 325 330 335  
 gtt cgc atc atg gcg gcc ttt tac aag gtt ggt cgc gac cgt tac cag 2111  
 Val Arg Ile Met Ala Ala Phe Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Tyr Gln  
 340 345 350  
 25 gtg ccg gtc aac ttc gac tgc tgg acg aag gat gaa tac ggt tac gag 2159  
 Val Pro Val Asn Phe Asp Ser Trp Thr Lys Asp Glu Tyr Gly Tyr Glu  
 355 360 365  
 cac gca ctg gtt ggc cag aac tat gtc aag gtc aat gac aag gtg gat 2207  
 His Ala Leu Val Gly Gln Asn Tyr Val Lys Val Asn Asp Lys Val Asp  
 30 370 375 380  
 gtt cgt gcc gac cat gcg gac atc atc cgt caa att ggg tct gct agt 2255



|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | aac ccc aac gtc acc gcc atc gtc tgg gcc ggt ctt cca ggc cag gag | 2845 |
|    | Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu |      |
|    | 545 550 555                                                     |      |
|    | agc ggc aac agt ctc gtc gat gtg ctc tac ggc cgt gtc agc ccc gga | 2893 |
| 5  | Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ser Pro Gly |      |
|    | 560 565 570 575                                                 |      |
|    | gga aag acg ccg ttt acg tgg gga aag act cgc gag tcg tac ggc gct | 2941 |
|    | Gly Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Ala |      |
|    | 580 585 590                                                     |      |
| 10 | cct ctg ctc acc aaa ccc aac aac ggc aag ggt gct ccc cag gac gac | 2989 |
|    | Pro Leu Leu Thr Lys Pro Asn Asn Gly Lys Gly Ala Pro Gln Asp Asp |      |
|    | 595 600 605                                                     |      |
|    | ttc acc gag ggc gtc ttc atc gac tac aga agg ttc gac aag tac aac | 3037 |
|    | Phe Thr Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg Arg Phe Asp Lys Tyr Asn |      |
| 15 | 610 615 620                                                     |      |
|    | gag acg ccc atc tat gag ttc ggg ttt ggt ctg agt tat act act ttt | 3085 |
|    | Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe |      |
|    | 625 630 635                                                     |      |
|    | gaa tac tcg aac atc tac gtc cag ccc ctt aac gca cga cct tac acc | 3133 |
| 20 | Glu Tyr Ser Asn Ile Tyr Val Gln Pro Leu Asn Ala Arg Pro Tyr Thr |      |
|    | 640 645 650 655                                                 |      |
|    | cca gcc tcc ggc agc acc aag gcg gct cct acc ttt ggg aat atc agc | 3181 |
|    | Pro Ala Ser Gly Ser Thr Lys Ala Ala Pro Thr Phe Gly Asn Ile Ser |      |
|    | 660 665 670                                                     |      |
| 25 | acg gac tat gca gat tac ttg tac cct gag gat ata cac aag gtc cca | 3229 |
|    | Thr Asp Tyr Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Asp Ile His Lys Val Pro |      |
|    | 675 680 685                                                     |      |
|    | tta tac atc tat cct tgg ctt aac acg acg gac ccc gaa gaa gtc ctc | 3277 |
|    | Leu Tyr Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Thr Thr Asp Pro Glu Glu Val Leu |      |
| 30 | 690 695 700                                                     |      |
|    | cgg cga tcc cga ctt acg gaa atg aag gcc gag gac tac atc cca tct | 3325 |

Arg Arg Ser Arg Leu Thr Glu Met Lys Ala Glu Asp Tyr Ile Pro Ser  
 705 710 715  
 ggc gcg act gat gga tct cct cag ccc atc ctt ccg gca ggc ggt gct 3373  
 Gly Ala Thr Asp Gly Ser Pro Gln Pro Ile Leu Pro Ala Gly Gly Ala  
 5 720 725 730 735  
 cct ggt ggc aac ccg ggt ctc tat gat gag atg tac agg gta tct gca 3421  
 Pro Gly Gly Asn Pro Gly Leu Tyr Asp Glu Met Tyr Arg Val Ser Ala  
 740 745 750  
 atc atc acc aac acc ggt aac gtt gtt ggt gat gag gtt cct cag ctg 3469  
 10 Ile Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Val Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu  
 755 760 765  
 gtgagtttcg cagtctcatt gatatatgtc ttccgagttg gtcactgacc cgcgatctat 3529  
 ag tat gtc tct ctt ggt ggt cca gat gac ccc aag gtc gtg ctc cgc 3576  
 Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asp Asp Pro Lys Val Val Leu Arg  
 15 770 775 780  
 aac ttt gac cgc atc acg ctc cac ccc ggc caa cag aca atg tgg acc 3624  
 Asn Phe Asp Arg Ile Thr Leu His Pro Gly Gln Gln Thr Met Trp Thr  
 785 790 795  
 acg aca ttg acg cga cgc gat atc tcg aac tgg gac cct gcc tcc cag 3672  
 20 Thr Thr Leu Thr Arg Arg Asp Ile Ser Asn Trp Asp Pro Ala Ser Gln  
 800 805 810  
 aat tgg gtt gtg acc aaa tat ccc aag aca gtc tac atc ggc agc tct 3720  
 Asn Trp Val Val Thr Lys Tyr Pro Lys Thr Val Tyr Ile Gly Ser Ser  
 815 820 825 830  
 25 tcg cgg aaa ctg cac ctg cag gca ccg ctt ccc cct tac tgaggtttta 3769  
 Ser Arg Lys Leu His Leu Gln Ala Pro Leu Pro Pro Tyr  
 835 840  
 tccggaagga ggaagtaaaa acacaatgtt ttagttgtac aggcgtcttt cgtttgtgat 3829  
 tatccatagg catatcaaga ccactttggg ttatatatat atatatatat ataagcggcc 3889  
 30 gaggaagggc aatgggtagc atgggttcaag gggaggaacc gtcttgaaac tactctcaat 3949  
 ttctttcagt agatagtgca ctccggttga gtcccaaata tagttttaat aatggtaaat 4009  
 gggttcagaaa aagaaaatgt agaggtttca aacacgctag ttgaccctga taggaattga 4069

gcatgaatgc ctacacattc caagtcgtgt tagcgagtcg atagccgatg aacctattcc 4129  
 gtaggttgag gttcaccta caaataagcc aggatttaag taaataacctg ctcgtgaaat 4189  
 ctacaacgca tcagatcaga ggaaaattca aatggcagaa gtgcgagcac ctcggtgaga 4249  
 agagatcgag ctgtcgaagt cggctggaac acaggtaaag agaagtaata caattcattg 4309  
 5 atttttacat cgtttaacat gtagaaggta tctaaaatag taagtccaga tatgggcat 4369  
 ggagatcgcc tcggcgatct tcgggagtat ctcgggagac gcacatgacc gcgcttaacc 4429  
 ctgtcgggtg gacccgagtc cgaccgacgt catcagcgca gcgcaggtca ggctgcgcgc 4489  
 aacgtcaatg ccagggggtg ctgggacagt tgcatatcaa tcgatcagtc aattaaagca 4549  
 tctgctttcc acgttctttt ttatcacct ttcacttccc ctgtcccact tgccttgga 4609  
 10 ttgttgagcc caaagaagaa ggagaagaaa atgggctcga caccgccgaa cgggtggtcg 4669  
 acgagcacat catcagcagc gtcttattat caacattccc aaccaccggc cctcgttctc 4729  
 ctcgtctacc cgctcactct cctcctcggc tccctgtaca gagccatttc cccaccgcg 4789  
 cgggtgaggc acgatgctgc agaccctgct ctggccccga ccatagcgtc cgacatcaac 4849  
 ctgtcccagt catcccggtg ttcccattcc catagcaaca gcaacagccc ggtcaattac 4909  
 15 ttgccccgca aggacaacat ctttaacgtc tacttcgtca agatcggtg gttctggacg 4969  
 accctcgctt tcctcacgtt actcctcacc cagcctgcct acacaaacgc cggctcccctg 5029  
 cgcgccccgac gcaccctcca agccctgtcc cgctacgcca tcgtcacctt actacctgga 5089  
 tcc 5092  
 <210> 22  
 20 <211> 843  
 <212> PRT  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*  
 <400> 22  
 Met Arg Leu Gly Trp Leu Glu Leu Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Val  
 25 1 5 10 15  
 Ala Ser Ala Lys Asp Asp Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser  
 20 25 30  
 Pro Trp Met Asn Gly Asn Gly Glu Trp Ala Glu Ala Tyr Arg Arg Ala  
 35 40 45  
 30 Val Asp Phe Val Ser Gln Leu Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr  
 50 55 60

Thr Gly Val Gly Trp Met Gln Glu Lys Cys Val Gly Glu Thr Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Arg Leu Gly Phe Arg Gly Leu Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu  
 85 90 95  
 5 Gly Val Arg Phe Ala Asp Tyr Val Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn  
 100 105 110  
 Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Asn Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Lys Ala  
 115 120 125  
 Met Gly Glu Glu His Arg Gly Lys Gly Val Asp Val Gln Leu Gly Pro  
 10 130 135 140  
 Val Ala Gly Pro Leu Gly Arg His Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu  
 145 150 155 160  
 Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Val Leu Met Ala Glu Thr  
 165 170 175  
 15 Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Phe  
 180 185 190  
 Ile Gly Asn Glu Met Glu His Phe Arg Gln Ala Gly Glu Ala Val Gly  
 195 200 205  
 Tyr Gly Phe Asp Ile Thr Glu Ser Val Ser Ser Asn Ile Asp Asp Lys  
 20 210 215 220  
 Thr Leu His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Val Gly Ser Phe Met Cys Ser Tyr Asn Gln Val Asn Asn Ser Tyr  
 245 250 255  
 25 Ser Cys Ser Asn Ser Tyr Leu Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ser Glu Leu  
 260 265 270  
 Asp Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Gly Ala His His Ser Gly  
 275 280 285  
 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Thr  
 30 290 295 300  
 Ala Phe Gly Thr Gly Lys Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Ile Ala  
 305 310 315 320

Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Glu Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val  
 325 330 335  
 Arg Ile Met Ala Ala Phe Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Tyr Gln Val  
 340 345 350  
 5 Pro Val Asn Phe Asp Ser Trp Thr Lys Asp Glu Tyr Gly Tyr Glu His  
 355 360 365  
 Ala Leu Val Gly Gln Asn Tyr Val Lys Val Asn Asp Lys Val Asp Val  
 370 375 380  
 Arg Ala Asp His Ala Asp Ile Ile Arg Gln Ile Gly Ser Ala Ser Val  
 10 385 390 395 400  
 Val Leu Leu Lys Asn Asp Gly Gly Leu Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Lys  
 405 410 415  
 Phe Thr Gly Val Phe Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Arg Trp Gly Ala  
 420 425 430  
 15 Asp Gly Cys Ser Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Gly  
 435 440 445  
 Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asp Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln  
 450 455 460  
 Ala Ile Gln Asn Glu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Gly Leu Asp Ser Val  
 20 465 470 475 480  
 Ser Ile Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Asn Val  
 485 490 495  
 Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp Lys Gly Gly  
 500 505 510  
 25 Glu Glu Val Ile Lys Thr Val Ala Ala Asn Cys Asn Asn Thr Ile Val  
 515 520 525  
 Val Met His Thr Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Glu Trp Tyr Asp Asn  
 530 535 540  
 Pro Asn Val Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser  
 30 545 550 555 560  
 Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ser Pro Gly Gly  
 565 570 575

Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Ala Pro  
 580 585 590  
 Leu Leu Thr Lys Pro Asn Asn Gly Lys Gly Ala Pro Gln Asp Asp Phe  
 595 600 605  
 5 Thr Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg Arg Phe Asp Lys Tyr Asn Glu  
 610 615 620  
 Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Glu  
 625 630 635 640  
 Tyr Ser Asn Ile Tyr Val Gln Pro Leu Asn Ala Arg Pro Tyr Thr Pro  
 10 645 650 655  
 Ala Ser Gly Ser Thr Lys Ala Ala Pro Thr Phe Gly Asn Ile Ser Thr  
 660 665 670  
 Asp Tyr Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Asp Ile His Lys Val Pro Leu  
 675 680 685  
 15 Tyr Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Thr Thr Asp Pro Glu Glu Val Leu Arg  
 690 695 700  
 Arg Ser Arg Leu Thr Glu Met Lys Ala Glu Asp Tyr Ile Pro Ser Gly  
 705 710 715 720  
 Ala Thr Asp Gly Ser Pro Gln Pro Ile Leu Pro Ala Gly Gly Ala Pro  
 20 725 730 735  
 Gly Gly Asn Pro Gly Leu Tyr Asp Glu Met Tyr Arg Val Ser Ala Ile  
 740 745 750  
 Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Val Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu Tyr  
 755 760 765  
 25 Val Ser Leu Gly Gly Pro Asp Asp Pro Lys Val Val Leu Arg Asn Phe  
 770 775 780  
 Asp Arg Ile Thr Leu His Pro Gly Gln Gln Thr Met Trp Thr Thr Thr  
 785 790 795 800  
 Leu Thr Arg Arg Asp Ile Ser Asn Trp Asp Pro Ala Ser Gln Asn Trp  
 30 805 810 815  
 Val Val Thr Lys Tyr Pro Lys Thr Val Tyr Ile Gly Ser Ser Ser Arg  
 820 825 830

Lys Leu His Leu Gln Ala Pro Leu Pro Pro Tyr

835

840

<210> 23  
 <211> 3510  
 5 <212> DNA  
 <213> Acremonium thermophilum  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (391)..(447)  
 10 <223>  
 <220>  
 <221> intron  
 <222> (448)..(539)  
 <223>  
 15 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (540)..(685)  
 <223>  
 <220>  
 20 <221> intron  
 <222> (686)..(759)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 25 <222> (760)..(1148)  
 <223>  
 <220>  
 <221> intron  
 <222> (1149)..(1217)  
 30 <223>  
 <220>  
 <221> CDS

&lt;222&gt; (1218)..(3208)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 23

gcaggtagct acgacattcg acggtccacg cccagtgggc tctgctcggc cgtctgggaa 60  
5 ccatgcacgc ccgcctctta ggtcgagcga ggtataacat actatctgca cggctaccta 120  
tatattacgt cgatgtcacc cgcaggatgc gagcaccatt acttcgtgtc tcacccgccc 180  
ttccgctcgg catctcgtga acctaaaccc acgcgggcac actgcttctt gtgagagcct 240  
ctacccgttc cacaagagcc atagctagag agagaagggc agccaaggga ccggtcaagc 300  
ggcgtctctt atcgacacaa tctcgacaac ccggcagacg tcaccaccgg ctcccgcgcg 360  
10 acgacgtcac acgggactga ctacgaagac atg agg cag gcc ctt gtt tgc ctg 414  
Met Arg Gln Ala Leu Val Ser Leu  
1 5  
gcc ttg ctg gcc agc agc cct gtt tgc gcg gcg gtgaccgcca gggacgcca 467  
Ala Leu Leu Ala Ser Ser Pro Val Ser Ala Ala  
15 10 15  
ggatatgggcc caactgctct tctccctgt ttctcctct accggtgctg acaacgacaa 527  
tagctgcacc ag cga gaa ctc gcc act tcc gac cct ttc tat cct tgc cca 578  
Arg Glu Leu Ala Thr Ser Asp Pro Phe Tyr Pro Ser Pro  
20 25 30  
20 tgg atg aac cct gaa gcc aat ggc tgg gag gac gcc tac gcc aag gcc 626  
Trp Met Asn Pro Glu Ala Asn Gly Trp Glu Asp Ala Tyr Ala Lys Ala  
35 40 45  
aag gcg ttc gtt tcc cag ctg acg ctc ttg gaa aag gtc aac ctg acg 674  
Lys Ala Phe Val Ser Gln Leu Thr Leu Leu Glu Lys Val Asn Leu Thr  
25 50 55 60  
act ggc atc gg gtgagtcttg ttctctctg tagaaccgcc taccagaaga 725  
Thr Gly Ile Gly  
65  
cattcaggaa gtgctaata tgggcgggtg acag c tgg caa gga gga caa tgc 778  
30 Trp Gln Gly Gly Gln Cys  
70  
gtg ggc aac gtc ggt tcc gtc ccg cgt ctc ggc ctt cgc agc ctg tgc 826

Val Gly Asn Val Gly Ser Val Pro Arg Leu Gly Leu Arg Ser Leu Cys  
 75 80 85 90  
 atg cag gac tcc ccc gtg ggt atc cgc ttt ggg gac tac gtc tcc gtc 874  
 Met Gln Asp Ser Pro Val Gly Ile Arg Phe Gly Asp Tyr Val Ser Val  
 5 95 100 105  
 ttc ccc tct ggt cag acc acg gct gcc acc ttc gac aag ggt ctg atg 922  
 Phe Pro Ser Gly Gln Thr Thr Ala Ala Thr Phe Asp Lys Gly Leu Met  
 110 115 120  
 aac cgt cgc ggc aat gcc atg ggc cag gag cac aaa gga aag ggt gtc 970  
 10 Asn Arg Arg Gly Asn Ala Met Gly Gln Glu His Lys Gly Lys Gly Val  
 125 130 135  
 aac gtc ctg ctc ggc ccg gtc gct ggc ccc att ggc cgt acg ccc gag 1018  
 Asn Val Leu Leu Gly Pro Val Ala Gly Pro Ile Gly Arg Thr Pro Glu  
 140 145 150  
 15 ggg gga cga aac tgg gag ggc ttc tcc ccc gac ccc gtc cta acg ggt 1066  
 Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly  
 155 160 165 170  
 att gcc ttg gcc gaa acg atc aag gga atc cag gat gct ggt gtc att 1114  
 Ile Ala Leu Ala Glu Thr Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile  
 20 175 180 185  
 gct tgc gcc aag cat ttc atc gcg aac gaa cag g gtgcgtgatg 1158  
 Ala Cys Ala Lys His Phe Ile Ala Asn Glu Gln  
 190 195  
 gaacgcggga cgtgctctga tgcaaaccga cgagcactga ccacgctttc ctcgaacag 1217  
 25 aa cac ttc cgc cag tcc ggc gag gcc cag ggc tac ggc ttt gac atc 1264  
 Glu His Phe Arg Gln Ser Gly Glu Ala Gln Gly Tyr Gly Phe Asp Ile  
 200 205 210  
 tcc gag tcg ctg tcg tcc aac atc gac gac aag acc atg cac gag ctg 1312  
 Ser Glu Ser Leu Ser Ser Asn Ile Asp Asp Lys Thr Met His Glu Leu  
 30 215 220 225  
 tat ctg tgg ccc ttc gcc gac ggc gtg cgt gcc ggc gtc ggc gcc atc 1360

Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Gly Val Arg Ala Gly Val Gly Ala Ile  
 230 235 240 245  
 atg tgc tcg tac aac cag atc aac aac tcg tac ggg tgc cag aac tcc 1408  
 Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly Cys Gln Asn Ser  
 5 250 255 260  
 aag acc ctg aac aac ctg ctc aag aac gag ctc ggc ttc cag ggc ttc 1456  
 Lys Thr Leu Asn Asn Leu Leu Lys Asn Glu Leu Gly Phe Gln Gly Phe  
 265 270 275  
 gtc atg agc gac tgg cag gcc cag cac acc ggc gcg gcc agc gcc gtc 1504  
 10 Val Met Ser Asp Trp Gln Ala Gln His Thr Gly Ala Ala Ser Ala Val  
 280 285 290  
 gcc ggc ctg gac atg acc atg ccc ggc gac acc agc ttc aac acc ggc 1552  
 Ala Gly Leu Asp Met Thr Met Pro Gly Asp Thr Ser Phe Asn Thr Gly  
 295 300 305  
 15 ctc agc tac tgg ggc acg aac ctc acc ctc gcc gtc ctg aac ggc acc 1600  
 Leu Ser Tyr Trp Gly Thr Asn Leu Thr Leu Ala Val Leu Asn Gly Thr  
 310 315 320 325  
 gtc ccc gag tac cgc atc gac gac atg gtc atg cgc atc atg gcc gcc 1648  
 Val Pro Glu Tyr Arg Ile Asp Asp Met Val Met Arg Ile Met Ala Ala  
 20 330 335 340  
 ttc ttc aag acc ggc cag acc ctg gac ctg ccg ccc atc aac ttc gac 1696  
 Phe Phe Lys Thr Gly Gln Thr Leu Asp Leu Pro Pro Ile Asn Phe Asp  
 345 350 355  
 tcg tgg acc acc gac acc ttc ggc ccg ctc cac ttc gcc gtc aac gag 1744  
 25 Ser Trp Thr Thr Asp Thr Phe Gly Pro Leu His Phe Ala Val Asn Glu  
 360 365 370  
 gac cgc cag cag atc aac tgg cac gtc aac gtc cag gac aac cat ggc 1792  
 Asp Arg Gln Gln Ile Asn Trp His Val Asn Val Gln Asp Asn His Gly  
 375 380 385  
 30 agc ctc atc cgc gag atc gcg gcc aag gga acc gtc ctg ctg aag aac 1840  
 Ser Leu Ile Arg Glu Ile Ala Ala Lys Gly Thr Val Leu Leu Lys Asn  
 390 395 400 405

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | acc ggg tcc ctc ccg ctc aac aag ccc aag ttc ctc gtc gtg gtc ggc | 1888 |
|    | Thr Gly Ser Leu Pro Leu Asn Lys Pro Lys Phe Leu Val Val Val Gly |      |
|    | 410 415 420                                                     |      |
|    | gac gac gcg ggc ccc aac ccg gcg gga ccc aac gcc tgc ccc gac cgc | 1936 |
| 5  | Asp Asp Ala Gly Pro Asn Pro Ala Gly Pro Asn Ala Cys Pro Asp Arg |      |
|    | 425 430 435                                                     |      |
|    | gga tgc gac gtc ggc acc ctc ggc atg gcc tgg ggc tcc ggc tcg gcc | 1984 |
|    | Gly Cys Asp Val Gly Thr Leu Gly Met Ala Trp Gly Ser Gly Ser Ala |      |
|    | 440 445 450                                                     |      |
| 10 | aac ttc ccc tac ctg atc acc ccg gac gcc gcg ctg cag gcg cag gcg | 2032 |
|    | Asn Phe Pro Tyr Leu Ile Thr Pro Asp Ala Ala Leu Gln Ala Gln Ala |      |
|    | 455 460 465                                                     |      |
|    | atc aag gac ggc acc cgc tac gag agc gtg ctg tcc aac tac cag ctc | 2080 |
|    | Ile Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Glu Ser Val Leu Ser Asn Tyr Gln Leu |      |
| 15 | 470 475 480 485                                                 |      |
|    | gac cag acc aag gcg ctg gtc acc cag gcc aac gcc acg gcc atc gtc | 2128 |
|    | Asp Gln Thr Lys Ala Leu Val Thr Gln Ala Asn Ala Thr Ala Ile Val |      |
|    | 490 495 500                                                     |      |
|    | ttc gtc aac gcc gac tcg ggc gag ggc tac atc aac gtc gac ggc aac | 2176 |
| 20 | Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Asn Val Asp Gly Asn |      |
|    | 505 510 515                                                     |      |
|    | gag ggc gac cgc aag aac ctc acg ctc tgg cac gac ggc gac gcc ctg | 2224 |
|    | Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp His Asp Gly Asp Ala Leu |      |
|    | 520 525 530                                                     |      |
| 25 | atc aag agc gtg gcc ggc tgg aac ccg aac acc atc gtc gtc atc cac | 2272 |
|    | Ile Lys Ser Val Ala Gly Trp Asn Pro Asn Thr Ile Val Val Ile His |      |
|    | 535 540 545                                                     |      |
|    | tcg acc ggc ccc gtc ctc gtg acc gac tgg tac gac cac ccc aac atc | 2320 |
|    | Ser Thr Gly Pro Val Leu Val Thr Asp Trp Tyr Asp His Pro Asn Ile |      |
| 30 | 550 555 560 565                                                 |      |
|    | acc gcc atc ctg tgg gcc ggc gtg ccc ggg cag gag tcc ggc aac gcc | 2368 |

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|-----|--|
|    | Thr | Ala | Ile | Leu | Trp | Ala | Gly | Val | Pro | Gly | Gln | Glu | Ser | Gly | Asn | Ala |      |  |     |  |
|    | 570 |     |     |     |     |     |     |     | 575 |     |     |     |     |     | 580 |     |      |  |     |  |
|    | atc | acc | gac | gtc | ctc | tac | gga | aaa | gtc | aac | ccg | tcg | ggc | cgc | agc | ccc | 2416 |  |     |  |
|    | Ile | Thr | Asp | Val | Leu | Tyr | Gly | Lys | Val | Asn | Pro | Ser | Gly | Arg | Ser | Pro |      |  |     |  |
| 5  | 585 |     |     |     |     |     |     |     | 590 |     |     |     |     |     | 595 |     |      |  |     |  |
|    | ttc | acc | tgg | ggt | ccg | acc | cgc | gag | agc | tac | ggc | acc | gac | gtc | ctc | tac | 2464 |  |     |  |
|    | Phe | Thr | Trp | Gly | Pro | Thr | Arg | Glu | Ser | Tyr | Gly | Thr | Asp | Val | Leu | Tyr |      |  |     |  |
|    | 600 |     |     |     |     |     |     |     | 605 |     |     |     |     |     | 610 |     |      |  |     |  |
|    | act | ccc | aac | aac | ggc | aag | ggc | gcg | ccg | cag | cag | gcc | ttc | tcc | gag | ggc | 2512 |  |     |  |
| 10 | Thr | Pro | Asn | Asn | Gly | Lys | Gly | Ala | Pro | Gln | Gln | Ala | Phe | Ser | Glu | Gly |      |  |     |  |
|    | 615 |     |     |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |     | 625 |     |      |  |     |  |
|    | gtc | ttc | atc | gac | tac | cgc | cac | ttc | gac | cgc | acc | aac | gcg | tcc | gtc | atc | 2560 |  |     |  |
|    | Val | Phe | Ile | Asp | Tyr | Arg | His | Phe | Asp | Arg | Thr | Asn | Ala | Ser | Val | Ile |      |  |     |  |
|    | 630 |     |     |     |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     |     | 640 |     |      |  | 645 |  |
| 15 | tac | gag | ttc | ggc | cac | ggc | ctc | agc | tac | acg | acg | ttc | cag | tac | agc | aac | 2608 |  |     |  |
|    | Tyr | Glu | Phe | Gly | His | Gly | Leu | Ser | Tyr | Thr | Thr | Phe | Gln | Tyr | Ser | Asn |      |  |     |  |
|    | 650 |     |     |     |     |     |     |     | 655 |     |     |     |     |     | 660 |     |      |  |     |  |
|    | atc | cag | gtg | gtc | aag | tcc | aac | gcc | ggc | gcg | tac | aag | ccc | acg | acg | ggc | 2656 |  |     |  |
|    | Ile | Gln | Val | Val | Lys | Ser | Asn | Ala | Gly | Ala | Tyr | Lys | Pro | Thr | Thr | Gly |      |  |     |  |
| 20 | 665 |     |     |     |     |     |     |     | 670 |     |     |     |     |     | 675 |     |      |  |     |  |
|    | acg | acc | atc | ccc | gcg | ccc | acg | ttt | ggc | agc | ttc | tcc | aag | gac | ctc | aag | 2704 |  |     |  |
|    | Thr | Thr | Ile | Pro | Ala | Pro | Thr | Phe | Gly | Ser | Phe | Ser | Lys | Asp | Leu | Lys |      |  |     |  |
|    | 680 |     |     |     |     |     |     |     | 685 |     |     |     |     |     | 690 |     |      |  |     |  |
|    | gac | tac | ctc | ttc | ccg | tcg | gac | cag | ttc | cgc | tac | atc | acc | cag | tac | atc | 2752 |  |     |  |
| 25 | Asp | Tyr | Leu | Phe | Pro | Ser | Asp | Gln | Phe | Arg | Tyr | Ile | Thr | Gln | Tyr | Ile |      |  |     |  |
|    | 695 |     |     |     |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |     | 705 |     |      |  |     |  |
|    | tac | ccg | tac | ctc | aac | tcc | acc | gac | ccg | gcc | aag | gcg | tcg | ctc | gac | ccg | 2800 |  |     |  |
|    | Tyr | Pro | Tyr | Leu | Asn | Ser | Thr | Asp | Pro | Ala | Lys | Ala | Ser | Leu | Asp | Pro |      |  |     |  |
|    | 710 |     |     |     |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     |     | 720 |     |      |  | 725 |  |
| 30 | cac | tac | ggc | aag | acg | gcg | gcc | gag | ttt | ctg | ccg | ccg | cac | gcg | ctg | gac | 2848 |  |     |  |
|    | His | Tyr | Gly | Lys | Thr | Ala | Ala | Glu | Phe | Leu | Pro | Pro | His | Ala | Leu | Asp |      |  |     |  |
|    | 730 |     |     |     |     |     |     |     | 735 |     |     |     |     |     | 740 |     |      |  |     |  |

|    |                                                                    |      |
|----|--------------------------------------------------------------------|------|
|    | agc aac ccg cag ccg ctg ctg cgg tcg tcg ggc aag aac gag ccc ggc    | 2896 |
|    | Ser Asn Pro Gln Pro Leu Leu Arg Ser Ser Gly Lys Asn Glu Pro Gly    |      |
|    | 745 750 755                                                        |      |
|    | ggc aac cgc cag ctg tac gac atc ctg tac acg gtg acg gcg gac atc    | 2944 |
| 5  | Gly Asn Arg Gln Leu Tyr Asp Ile Leu Tyr Thr Val Thr Ala Asp Ile    |      |
|    | 760 765 770                                                        |      |
|    | acc aac acg ggc agc atc gtg ggt gcg gag gtg ccg cag ctg tac gtg    | 2992 |
|    | Thr Asn Thr Gly Ser Ile Val Gly Ala Glu Val Pro Gln Leu Tyr Val    |      |
|    | 775 780 785                                                        |      |
| 10 | tcg ctg ggc ggg ccc gac gac ccc aaa gtg gtc ctg cgc ggg ttc gac    | 3040 |
|    | Ser Leu Gly Gly Pro Asp Asp Pro Lys Val Val Leu Arg Gly Phe Asp    |      |
|    | 790 795 800 805                                                    |      |
|    | cgc atc cgc atc gac ccg ggc aag acg gcg cag ttc cgc gtc acc ctg    | 3088 |
|    | Arg Ile Arg Ile Asp Pro Gly Lys Thr Ala Gln Phe Arg Val Thr Leu    |      |
| 15 | 810 815 820                                                        |      |
|    | acc cgc cgg gat ctc agc aac tgg gac ccg gcg atc cag gac tgg gtc    | 3136 |
|    | Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Pro Ala Ile Gln Asp Trp Val    |      |
|    | 825 830 835                                                        |      |
|    | atc agc aag tac ccc aag aag gtg tac atc ggc cgg agc agc agg aag    | 3184 |
| 20 | Ile Ser Lys Tyr Pro Lys Lys Val Tyr Ile Gly Arg Ser Ser Arg Lys    |      |
|    | 840 845 850                                                        |      |
|    | ctg gaa ctc tcc gcc gac ctc gcg tgatccggcg acggccaagt acgtatgtg    | 3238 |
|    | Leu Glu Leu Ser Ala Asp Leu Ala                                    |      |
|    | 855 860                                                            |      |
| 25 | actgccatcc gaacacctat actttttggc taggtagggg gagcagcaag gcctgagcat  | 3298 |
|    | atactctctc cattgcacat ttctaattgta aatatatata tcattaattg ggagacccaa | 3358 |
|    | actcgaattt atgcatgcgt acaaagtgtg ttgaacaagt ttcggtccag cagatagtaa  | 3418 |
|    | ccgtcttagt tcgtccatcc ctctctogaa tgcgctgtat acacatgcgt atatagacgt  | 3478 |
|    | tgtataggtg ccattgctag caatgcaagc tt                                | 3510 |
| 30 | <210> 24                                                           |      |
|    | <211> 861                                                          |      |
|    | <212> PRT                                                          |      |

&lt;213&gt; Acremonium thermophilum

&lt;400&gt; 24

Met Arg Gln Ala Leu Val Ser Leu Ala Leu Leu Ala Ser Ser Pro Val  
 1 5 10 15

5 Ser Ala Ala Arg Glu Leu Ala Thr Ser Asp Pro Phe Tyr Pro Ser Pro  
 20 25 30

Trp Met Asn Pro Glu Ala Asn Gly Trp Glu Asp Ala Tyr Ala Lys Ala  
 35 40 45

Lys Ala Phe Val Ser Gln Leu Thr Leu Leu Glu Lys Val Asn Leu Thr  
 10 50 55 60

Thr Gly Ile Gly Trp Gln Gly Gly Gln Cys Val Gly Asn Val Gly Ser  
 65 70 75 80

Val Pro Arg Leu Gly Leu Arg Ser Leu Cys Met Gln Asp Ser Pro Val  
 85 90 95

15 Gly Ile Arg Phe Gly Asp Tyr Val Ser Val Phe Pro Ser Gly Gln Thr  
 100 105 110

Thr Ala Ala Thr Phe Asp Lys Gly Leu Met Asn Arg Arg Gly Asn Ala  
 115 120 125

Met Gly Gln Glu His Lys Gly Lys Gly Val Asn Val Leu Leu Gly Pro  
 20 130 135 140

Val Ala Gly Pro Ile Gly Arg Thr Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp Glu  
 145 150 155 160

Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Ile Ala Leu Ala Glu Thr  
 165 170 175

25 Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His Phe  
 180 185 190

Ile Ala Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Ser Gly Glu Ala Gln Gly  
 195 200 205

Tyr Gly Phe Asp Ile Ser Glu Ser Leu Ser Ser Asn Ile Asp Asp Lys  
 30 210 215 220

Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Gly Val Arg Ala  
 225 230 235 240

Gly Val Gly Ala Ile Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr  
 245 250 255  
 Gly Cys Gln Asn Ser Lys Thr Leu Asn Asn Leu Leu Lys Asn Glu Leu  
 260 265 270  
 5 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Gln Ala Gln His Thr Gly  
 275 280 285  
 Ala Ala Ser Ala Val Ala Gly Leu Asp Met Thr Met Pro Gly Asp Thr  
 290 295 300  
 Ser Phe Asn Thr Gly Leu Ser Tyr Trp Gly Thr Asn Leu Thr Leu Ala  
 10 305 310 315 320  
 Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Glu Tyr Arg Ile Asp Asp Met Val Met  
 325 330 335  
 Arg Ile Met Ala Ala Phe Phe Lys Thr Gly Gln Thr Leu Asp Leu Pro  
 340 345 350  
 15 Pro Ile Asn Phe Asp Ser Trp Thr Thr Asp Thr Phe Gly Pro Leu His  
 355 360 365  
 Phe Ala Val Asn Glu Asp Arg Gln Gln Ile Asn Trp His Val Asn Val  
 370 375 380  
 Gln Asp Asn His Gly Ser Leu Ile Arg Glu Ile Ala Ala Lys Gly Thr  
 20 385 390 395 400  
 Val Leu Leu Lys Asn Thr Gly Ser Leu Pro Leu Asn Lys Pro Lys Phe  
 405 410 415  
 Leu Val Val Val Gly Asp Asp Ala Gly Pro Asn Pro Ala Gly Pro Asn  
 420 425 430  
 25 Ala Cys Pro Asp Arg Gly Cys Asp Val Gly Thr Leu Gly Met Ala Trp  
 435 440 445  
 Gly Ser Gly Ser Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Ile Thr Pro Asp Ala Ala  
 450 455 460  
 Leu Gln Ala Gln Ala Ile Lys Asp Gly Thr Arg Tyr Glu Ser Val Leu  
 30 465 470 475 480  
 Ser Asn Tyr Gln Leu Asp Gln Thr Lys Ala Leu Val Thr Gln Ala Asn  
 485 490 495

Ala Thr Ala Ile Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile  
500 505 510

Asn Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp His  
515 520 525

5 Asp Gly Asp Ala Leu Ile Lys Ser Val Ala Gly Trp Asn Pro Asn Thr  
530 535 540

Ile Val Val Ile His Ser Thr Gly Pro Val Leu Val Thr Asp Trp Tyr  
545 550 555 560

Asp His Pro Asn Ile Thr Ala Ile Leu Trp Ala Gly Val Pro Gly Gln  
10 565 570 575

Glu Ser Gly Asn Ala Ile Thr Asp Val Leu Tyr Gly Lys Val Asn Pro  
580 585 590

Ser Gly Arg Ser Pro Phe Thr Trp Gly Pro Thr Arg Glu Ser Tyr Gly  
595 600 605

15 Thr Asp Val Leu Tyr Thr Pro Asn Asn Gly Lys Gly Ala Pro Gln Gln  
610 615 620

Ala Phe Ser Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Arg Thr  
625 630 635 640

Asn Ala Ser Val Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr Thr  
20 645 650 655

Phe Gln Tyr Ser Asn Ile Gln Val Val Lys Ser Asn Ala Gly Ala Tyr  
660 665 670

Lys Pro Thr Thr Gly Thr Thr Ile Pro Ala Pro Thr Phe Gly Ser Phe  
675 680 685

25 Ser Lys Asp Leu Lys Asp Tyr Leu Phe Pro Ser Asp Gln Phe Arg Tyr  
690 695 700

Ile Thr Gln Tyr Ile Tyr Pro Tyr Leu Asn Ser Thr Asp Pro Ala Lys  
705 710 715 720

Ala Ser Leu Asp Pro His Tyr Gly Lys Thr Ala Ala Glu Phe Leu Pro  
30 725 730 735

Pro His Ala Leu Asp Ser Asn Pro Gln Pro Leu Leu Arg Ser Ser Gly  
740 745 750

Lys Asn Glu Pro Gly Gly Asn Arg Gln Leu Tyr Asp Ile Leu Tyr Thr  
 755 760 765  
 Val Thr Ala Asp Ile Thr Asn Thr Gly Ser Ile Val Gly Ala Glu Val  
 770 775 780  
 5 Pro Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asp Asp Pro Lys Val Val  
 785 790 795 800  
 Leu Arg Gly Phe Asp Arg Ile Arg Ile Asp Pro Gly Lys Thr Ala Gln  
 805 810 815  
 Phe Arg Val Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Pro Ala  
 10 820 825 830  
 Ile Gln Asp Trp Val Ile Ser Lys Tyr Pro Lys Lys Val Tyr Ile Gly  
 835 840 845  
 Arg Ser Ser Arg Lys Leu Glu Leu Ser Ala Asp Leu Ala  
 850 855 860  
 15 <210> 25  
 <211> 3392  
 <212> DNA  
 <213> Chaetomium thermophilum  
 <220>  
 20 <221> CDS  
 <222> (608)..(2405)  
 <223>  
 <220>  
 <221> Intron  
 25 <222> (2406)..(2457)  
 <223>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2458)..(2861)  
 30 <223>  
 <400> 25  
 tgcggggttg ctgcgactta attaataact ggcaaaacgg cccggagctc agctctgacc 60

|    |                                                                    |     |
|----|--------------------------------------------------------------------|-----|
|    | tccgccacat cgcctcggca ccatgccagc gcgttgcaac ggcatgaagc gctcagggttt | 120 |
|    | ttcttccgcc tgctccccac tgccgatggc catctgcacc ccagctcgtc acatttatct  | 180 |
|    | cgcgcacagc gtcttccac cagttgcctt gctcatgacg ctgttaaaga tggccctacc   | 240 |
|    | tagccgctga gtcccacaac gccgagatgt ctttggccct ttacaaggca cgccatggcc  | 300 |
| 5  | gtccaaggtc tgttcatgag tgtgtttgtg gggccgaagg acacctcagt ggccacgaaa  | 360 |
|    | tgccgccgag cgggccagca catgtcgaga gagacatgga catttatccc cgagatgctg  | 420 |
|    | tattagggaa ccggtccttt tctcggagcc gtgatccgag agcgttcggg agtcgttgag  | 480 |
|    | taaaagatgt cgagttgccg ttatatatcg cgggcctgta gctatgtgcc ctctattctc  | 540 |
|    | acaggttcaa tcatcagtcc tcgccgtgag acgtagcgcg ctgaactagc gctcgatac   | 600 |
| 10 | ttccgtc atg gct ctt cat gcc ttc ttg ttg ctg gca tca gca ttg ctg    | 649 |
|    | Met Ala Leu His Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ser Ala Leu Leu            |     |
|    | 1 5 10                                                             |     |
|    | gcc cgg ggt gcc ctg agc caa cct gac aac gtc cgt cgc gct gct ccg    | 697 |
|    | Ala Arg Gly Ala Leu Ser Gln Pro Asp Asn Val Arg Arg Ala Ala Pro    |     |
| 15 | 15 20 25 30                                                        |     |
|    | acc ggg acg gcc gcc tgg gat gcc gcc cac tcg cag gct gcc gct gcc    | 745 |
|    | Thr Gly Thr Ala Ala Trp Asp Ala Ala His Ser Gln Ala Ala Ala Ala    |     |
|    | 35 40 45                                                           |     |
|    | gtg tcg aga tta tca cag caa gac aag atc aac att gtc acc ggc gtt    | 793 |
| 20 | Val Ser Arg Leu Ser Gln Gln Asp Lys Ile Asn Ile Val Thr Gly Val    |     |
|    | 50 55 60                                                           |     |
|    | ggc tgg ggt aag ggt cct tgc gtc ggc aat acg aac cct gtc tac agc    | 841 |
|    | Gly Trp Gly Lys Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Asn Pro Val Tyr Ser    |     |
|    | 65 70 75                                                           |     |
| 25 | atc aac tac cca cag ctc tgc ctg cag gat ggc cca ctg ggt atc cgc    | 889 |
|    | Ile Asn Tyr Pro Gln Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly Ile Arg    |     |
|    | 80 85 90                                                           |     |
|    | tcc gcc acc agc gtc acg gcc ttc acg ccg ggc att caa gcc gcg tcg    | 937 |
|    | Ser Ala Thr Ser Val Thr Ala Phe Thr Pro Gly Ile Gln Ala Ala Ser    |     |
| 30 | 95 100 105 110                                                     |     |
|    | acc tgg gat gtg gag ttg atc cgg cag cgt ggt gtc tac cta gga cag    | 985 |

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | Thr Trp Asp Val Glu Leu Ile Arg Gln Arg Gly Val Tyr Leu Gly Gln |      |
|    | 115 120 125                                                     |      |
|    | gag gcc cgg gga act ggc gtg cat gtc ctg ctc ggc ccc gtg gcc ggt | 1033 |
|    | Glu Ala Arg Gly Thr Gly Val His Val Leu Leu Gly Pro Val Ala Gly |      |
| 5  | 130 135 140                                                     |      |
|    | gct ctt ggc aag atc ccg cac gga ggc cgt aac tgg gaa gcc ttc ggc | 1081 |
|    | Ala Leu Gly Lys Ile Pro His Gly Gly Arg Asn Trp Glu Ala Phe Gly |      |
|    | 145 150 155                                                     |      |
|    | tcc gac ccc tac ttg gcc ggt atc gct atg tcc gag acc atc gag ggc | 1129 |
| 10 | Ser Asp Pro Tyr Leu Ala Gly Ile Ala Met Ser Glu Thr Ile Glu Gly |      |
|    | 160 165 170                                                     |      |
|    | att cag tcg gag ggt gtg cag gct tgc gcg aag cac tac atc gcc aat | 1177 |
|    | Ile Gln Ser Glu Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile Ala Asn |      |
|    | 175 180 185 190                                                 |      |
| 15 | gag cag gaa ctc aac cgc gag aca atg agc agc aac gtc gac gac cgc | 1225 |
|    | Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Met Ser Ser Asn Val Asp Asp Arg |      |
|    | 195 200 205                                                     |      |
|    | act atg cac gag cta tac ctc tgg ccg ttc gcc gac gcc gtg cat tcc | 1273 |
|    | Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val His Ser |      |
| 20 | 210 215 220                                                     |      |
|    | aac gtg gcc agc gtc atg tgc agc tac aac aag ctc aac ggc acc tgg | 1321 |
|    | Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Leu Asn Gly Thr Trp |      |
|    | 225 230 235                                                     |      |
|    | ctc tgc gag aac gat agg gcc caa aac cag ctg ctt aag agg gag ctc | 1369 |
| 25 | Leu Cys Glu Asn Asp Arg Ala Gln Asn Gln Leu Leu Lys Arg Glu Leu |      |
|    | 240 245 250                                                     |      |
|    | ggc ttc cgc ggc tac atc gtg agc gac tgg aac gcg cag cac acc acc | 1417 |
|    | Gly Phe Arg Gly Tyr Ile Val Ser Asp Trp Asn Ala Gln His Thr Thr |      |
|    | 255 260 265 270                                                 |      |
| 30 | gtg ggc tcg gcc aac agt ggc atg gac atg acc atg cct ggc agc gac | 1465 |
|    | Val Gly Ser Ala Asn Ser Gly Met Asp Met Thr Met Pro Gly Ser Asp |      |
|    | 275 280 285                                                     |      |

ttc aac ggc tgg aac gtc ctc tgg ggt ccg cag ctc aac aac gcc gtc 1513  
 Phe Asn Gly Trp Asn Val Leu Trp Gly Pro Gln Leu Asn Asn Ala Val  
 290 295 300  
 aac agc ggc cag gtc tcg cag tcc cgc ctc aac gac atg gtc cag cgc 1561  
 5 Asn Ser Gly Gln Val Ser Gln Ser Arg Leu Asn Asp Met Val Gln Arg  
 305 310 315  
 att ctt gct gcg tgg tac ctc ctc ggc cag aac tcc gga tac ccg tcc 1609  
 Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Leu Gly Gln Asn Ser Gly Tyr Pro Ser  
 320 325 330  
 10 atc aac ctg cgt gcc aac gtc caa gcc aac cac aag gag aat gtg cgt 1657  
 Ile Asn Leu Arg Ala Asn Val Gln Ala Asn His Lys Glu Asn Val Arg  
 335 340 345 350  
 gcc gta gcc cgc gat ggc atc gtc ctc ctc aag aac gac ggc att ctg 1705  
 Ala Val Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp Gly Ile Leu  
 15 355 360 365  
 cct ctt cag cgt ccc aat aag att gct ctt gtc ggc tcc gcc gca gtc 1753  
 Pro Leu Gln Arg Pro Asn Lys Ile Ala Leu Val Gly Ser Ala Ala Val  
 370 375 380  
 gtc aac ccc cgt ggt atg aac gcc tgc gtg gac cgt ggc tgc aac gag 1801  
 20 Val Asn Pro Arg Gly Met Asn Ala Cys Val Asp Arg Gly Cys Asn Glu  
 385 390 395  
 ggt gcc ctt ggc atg ggc tgg ggc tca ggc acg gtc gag tat ccc tac 1849  
 Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Thr Val Glu Tyr Pro Tyr  
 400 405 410  
 25 ttt gtt gcg ccg tat gat gct ctg cgt gag cgg gca cag cgc gat ggc 1897  
 Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Leu Arg Glu Arg Ala Gln Arg Asp Gly  
 415 420 425 430  
 acg cag atc agt ctg cat gca tcg gac aat aca aac ggg gtt aac aac 1945  
 30 Thr Gln Ile Ser Leu His Ala Ser Asp Asn Thr Asn Gly Val Asn Asn  
 435 440 445  
 gcc gtg cag ggc gct gac gcg gcg ttt gtg ttc atc act gct gac tcc 1993

Ala Val Gln Gly Ala Asp Ala Ala Phe Val Phe Ile Thr Ala Asp Ser  
450 455 460  
ggc gaa ggg tac att acc gtt gag ggc cat gct ggc gac cgg aat cat 2041  
Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly His Ala Gly Asp Arg Asn His  
5 465 470 475  
ctg gat cct tgg cat aat ggt aac cag ctt gtg cag gct gtt gcg cag 2089  
Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Gln Leu Val Gln Ala Val Ala Gln  
480 485 490  
gca aat aag aac gtc att gtg gtt gtg cac agc gtt ggg ccg gtt att 2137  
10 Ala Asn Lys Asn Val Ile Val Val Val His Ser Val Gly Pro Val Ile  
495 500 505 510  
ctg gag acg atc ctc aat acg ccc ggt gtg agg gct gtt gtt tgg gct 2185  
Leu Glu Thr Ile Leu Asn Thr Pro Gly Val Arg Ala Val Val Trp Ala  
515 520 525  
15 ggc ttg ccg agc cag gag agc ggt aac gcg ctg gtt gat gtg ctg tac 2233  
Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala Leu Val Asp Val Leu Tyr  
530 535 540  
ggc ctt gtt tcg ccg tcg ggc aag ctt gtc tac acc att gcg aag agc 2281  
Gly Leu Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val Tyr Thr Ile Ala Lys Ser  
20 545 550 555  
ccg agc gac tac ccg act agc att gtc cgt ggc gat gat aac ttc cgc 2329  
Pro Ser Asp Tyr Pro Thr Ser Ile Val Arg Gly Asp Asp Asn Phe Arg  
560 565 570  
gag ggt ctg ttc atc gac tac agg cac ttc gat aac gcc cgg atc gag 2377  
25 Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Asn Ala Arg Ile Glu  
575 580 585 590  
ccc cgt ttc gag ttt ggc ttc ggt ctc t gtaagtctct taccactccg 2425  
Pro Arg Phe Glu Phe Gly Phe Gly Leu  
595  
30 ttttgtaaca acccgattct aacatccccc ag ca tac acc aac ttc agc tat 2477  
Ser Tyr Thr Asn Phe Ser Tyr

|    |                                                                     |      |
|----|---------------------------------------------------------------------|------|
|    | tcc aac ctg ggc atc tcc tcg tcc gca acc gcc ggc cca gcc acg ggc     | 2525 |
|    | Ser Asn Leu Gly Ile Ser Ser Ser Ala Thr Ala Gly Pro Ala Thr Gly     |      |
|    | 610 615 620                                                         |      |
|    | ccc acc gtc ccc ggc ggc ccg gcc gac ctc tgg aac tat gtc gcg acc     | 2573 |
| 5  | Pro Thr Val Pro Gly Gly Pro Ala Asp Leu Trp Asn Tyr Val Ala Thr     |      |
|    | 625 630 635                                                         |      |
|    | gtc acg gcg acc gtt acc aac acc gcc ggc gtg gaa ggt gcc gag gtc     | 2621 |
|    | Val Thr Ala Thr Val Thr Asn Thr Gly Gly Val Glu Gly Ala Glu Val     |      |
|    | 640 645 650                                                         |      |
| 10 | gct cag ctg tac atc tct ttg cca tct tcg gct cct gca tcg cca ccg     | 2669 |
|    | Ala Gln Leu Tyr Ile Ser Leu Pro Ser Ser Ala Pro Ala Ser Pro Pro     |      |
|    | 655 660 665 670                                                     |      |
|    | aag cag ctt cgt ggc ttt gtc aag ctt aag ttg gcg cct ggt caa agc     | 2717 |
|    | Lys Gln Leu Arg Gly Phe Val Lys Leu Lys Leu Ala Pro Gly Gln Ser     |      |
| 15 | 675 680 685                                                         |      |
|    | ggg acg gca acg ttt aga cta agg aag agg gat ttg gct tat tgg gat     | 2765 |
|    | Gly Thr Ala Thr Phe Arg Leu Arg Lys Arg Asp Leu Ala Tyr Trp Asp     |      |
|    | 690 695 700                                                         |      |
|    | gtg ggg agg cag aat tgg gtt gtt cct tcg ggg agg ttt gcc gtg ctt     | 2813 |
| 20 | Val Gly Arg Gln Asn Trp Val Val Pro Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu     |      |
|    | 705 710 715                                                         |      |
|    | gtg ggg gct agt tcg agg gat att agg ttg cag ggg gag att gtt gtt     | 2861 |
|    | Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg Leu Gln Gly Glu Ile Val Val     |      |
|    | 720 725 730                                                         |      |
| 25 | taggggggta tggttcagcac ctagtgggg aattgatgtg taagttggag taggggtttt   | 2921 |
|    | cgtgtacata cataccattt ggtcaatgtt acgacattta gtttatgaag tttcctgggtg  | 2981 |
|    | gctaccgctg atgagccctc gtatgatacc cacaatctat atgttttact cttctctttc   | 3041 |
|    | ctttttttctc ttcctttttcc tttattactt cattccttgt gtactttctg tgaacctcca | 3101 |
|    | gtcgaccatc cgaccecaatt cgaaagtctt tcctgacctg gtgcaggttg gcatattctc  | 3161 |
| 30 | gaaaggatgt cgaccttctt gaccctactg ggctaccggg aaagccctag gatggctgat   | 3221 |
|    | ggacagatct ggtgatcaac tatgggaaca ctccggagat ggtgactaat atgcgatggt   | 3281 |
|    | catttaaaga gcaccgcttc cagcgatctc cccagttgct cctcaacgat tgacacggcc   | 3341 |

aatttatcca gattccggga ttctctgagt gagctgtccc ttttttctag a

3392

<210> 26

<211> 734

<212> PRT

5 <213> Chaetomium thermophilum

<400> 26

Met Ala Leu His Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ser Ala Leu Leu Ala Arg

1 5 10 15

Gly Ala Leu Ser Gln Pro Asp Asn Val Arg Arg Ala Ala Pro Thr Gly

10 20 25 30

Thr Ala Ala Trp Asp Ala Ala His Ser Gln Ala Ala Ala Val Ser

35 40 45

Arg Leu Ser Gln Gln Asp Lys Ile Asn Ile Val Thr Gly Val Gly Trp

50 55 60

15 Gly Lys Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Asn Pro Val Tyr Ser Ile Asn

65 70 75 80

Tyr Pro Gln Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly Ile Arg Ser Ala

85 90 95

Thr Ser Val Thr Ala Phe Thr Pro Gly Ile Gln Ala Ala Ser Thr Trp

20 100 105 110

Asp Val Glu Leu Ile Arg Gln Arg Gly Val Tyr Leu Gly Gln Glu Ala

115 120 125

Arg Gly Thr Gly Val His Val Leu Leu Gly Pro Val Ala Gly Ala Leu

130 135 140

25 Gly Lys Ile Pro His Gly Gly Arg Asn Trp Glu Ala Phe Gly Ser Asp

145 150 155 160

Pro Tyr Leu Ala Gly Ile Ala Met Ser Glu Thr Ile Glu Gly Ile Gln

165 170 175

Ser Glu Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile Ala Asn Glu Gln

30 180 185 190

Glu Leu Asn Arg Glu Thr Met Ser Ser Asn Val Asp Asp Arg Thr Met

195 200 205

His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val His Ser Asn Val  
 210 215 220  
 Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Leu Asn Gly Thr Trp Leu Cys  
 225 230 235 240  
 5 Glu Asn Asp Arg Ala Gln Asn Gln Leu Leu Lys Arg Glu Leu Gly Phe  
 245 250 255  
 Arg Gly Tyr Ile Val Ser Asp Trp Asn Ala Gln His Thr Thr Val Gly  
 260 265 270  
 Ser Ala Asn Ser Gly Met Asp Met Thr Met Pro Gly Ser Asp Phe Asn  
 10 275 280 285  
 Gly Trp Asn Val Leu Trp Gly Pro Gln Leu Asn Asn Ala Val Asn Ser  
 290 295 300  
 Gly Gln Val Ser Gln Ser Arg Leu Asn Asp Met Val Gln Arg Ile Leu  
 305 310 315 320  
 15 Ala Ala Trp Tyr Leu Leu Gly Gln Asn Ser Gly Tyr Pro Ser Ile Asn  
 325 330 335  
 Leu Arg Ala Asn Val Gln Ala Asn His Lys Glu Asn Val Arg Ala Val  
 340 345 350  
 Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp Gly Ile Leu Pro Leu  
 20 355 360 365  
 Gln Arg Pro Asn Lys Ile Ala Leu Val Gly Ser Ala Ala Val Val Asn  
 370 375 380  
 Pro Arg Gly Met Asn Ala Cys Val Asp Arg Gly Cys Asn Glu Gly Ala  
 385 390 395 400  
 25 Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Thr Val Glu Tyr Pro Tyr Phe Val  
 405 410 415  
 Ala Pro Tyr Asp Ala Leu Arg Glu Arg Ala Gln Arg Asp Gly Thr Gln  
 420 425 430  
 Ile Ser Leu His Ala Ser Asp Asn Thr Asn Gly Val Asn Asn Ala Val  
 30 435 440 445  
 Gln Gly Ala Asp Ala Ala Phe Val Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu  
 450 455 460

Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly His Ala Gly Asp Arg Asn His Leu Asp  
 465                      470                      475                      480  
 Pro Trp His Asn Gly Asn Gln Leu Val Gln Ala Val Ala Gln Ala Asn  
                     485                      490                      495  
 5 Lys Asn Val Ile Val Val Val His Ser Val Gly Pro Val Ile Leu Glu  
                     500                      505                      510  
 Thr Ile Leu Asn Thr Pro Gly Val Arg Ala Val Val Trp Ala Gly Leu  
                     515                      520                      525  
 Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Leu  
 10                      530                      535                      540  
 Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Ser  
 545                      550                      555                      560  
 Asp Tyr Pro Thr Ser Ile Val Arg Gly Asp Asp Asn Phe Arg Glu Gly  
                     565                      570                      575  
 15 Leu Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Asn Ala Arg Ile Glu Pro Arg  
                     580                      585                      590  
 Phe Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Phe Ser Tyr Ser Asn  
                     595                      600                      605  
 Leu Gly Ile Ser Ser Ser Ala Thr Ala Gly Pro Ala Thr Gly Pro Thr  
 20                      610                      615                      620  
 Val Pro Gly Gly Pro Ala Asp Leu Trp Asn Tyr Val Ala Thr Val Thr  
 625                      630                      635                      640  
 Ala Thr Val Thr Asn Thr Gly Gly Val Glu Gly Ala Glu Val Ala Gln  
                     645                      650                      655  
 25 Leu Tyr Ile Ser Leu Pro Ser Ser Ala Pro Ala Ser Pro Pro Lys Gln  
                     660                      665                      670  
 Leu Arg Gly Phe Val Lys Leu Lys Leu Ala Pro Gly Gln Ser Gly Thr  
                     675                      680                      685  
 Ala Thr Phe Arg Leu Arg Lys Arg Asp Leu Ala Tyr Trp Asp Val Gly  
 30                      690                      695                      700  
 Arg Gln Asn Trp Val Val Pro Ser Gly Arg Phe Gly Val Leu Val Gly  
 705                      710                      715                      720

Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg Leu Gln Gly Glu Ile Val Val

725

730

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 1631

5

&lt;212&gt; DNA

<213> *Thermoascus aurantiacus*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Intron

&lt;222&gt; (610)..(674)

10

&lt;223&gt;

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (675)..(1628)

&lt;223&gt;

15

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(609)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 27

20

atg tat cag cgc gct ctt ctc ttc tct ttc ttc ctc gcc gcc gcc cgc 48

Met Tyr Gln Arg Ala Leu Leu Phe Ser Phe Phe Leu Ala Ala Ala Arg

1 5 10 15

gcg cag cag gcc ggt aoc gta acc gca gag aat cac cct tcc ctg acc 96

Ala Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr

25

20

25

30

tgg cag caa tgc tcc agc ggc ggt agt tgt acc acg cag aat gga aaa 144

Trp Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys

35

40

45

gtc gtt atc gat gcg aac tgg cgt tgg gtc cat acc acc tct gga tac 192

30

Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr

50

55

60

acc aac tgc tac acg ggc aat acg tgg gac acc agt atc tgt ccc gac 240

[illegible]

ggt tcc tgc tgc gct gag atg gat gtc tgg gaa gcc aac agc atc tct 782  
 Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser  
 225 230 235  
 act gcg gtg acg cct cac cca tgc gac acc ccc ggc cag acc atg tgc 830  
 5 Thr Ala Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys  
 240 245 250 255  
 cag gga gac gac tgt ggt gga acc tac tcc tcc act cga tat gct ggt 878  
 Gln Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly  
 260 265 270  
 10 acc tgc gac cct gat ggc tgc gac ttc aat cct tac cgc cag ggc aac 926  
 Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn  
 275 280 285  
 cac tcg ttc tac ggc ccc ggg cag atc gtc gac acc agc tcc aaa ttc 974  
 His Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe  
 15 290 295 300  
 acc gtc gtc acc cag ttc atc acc gac gac ggg acc ccc tcc ggc acc 1022  
 Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr  
 305 310 315  
 ctg acg gag atc aaa cgc ttc tac gtc cag aac ggc aag gta atc ccc 1070  
 20 Leu Thr Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro  
 320 325 330 335  
 cag tcg gag tcg acg atc agc ggc gtc acc ggc aac tca atc acc acc 1118  
 Gln Ser Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr  
 340 345 350  
 25 gag tat tgc acg gcc cag aag gcc gcc ttc ggc gac aac acc ggc ttc 1166  
 Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe  
 355 360 365  
 ttc acg cac ggc ggc ctt cag aag atc agt cag gct ctg gct cag ggc 1214  
 Phe Thr His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly  
 30 370 375 380  
 atg gtc ctc gtc atg agc ctg tgg gac gat cac gcc gcc aac atg ctc 1262

Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu  
385 390 395

tgg ctg gac agc acc tac ccg act gat gcg gac ccg gac acc cct ggc 1310  
Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly  
5 400 405 410 415

gtc gcg cgc ggt acc tgc ccc acg acc tcc ggc gtc ccg gcc gac gtt 1358  
Val Ala Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val  
420 425 430

gag tcg cag tac ccc aat tca tat gtt atc tac tcc aac atc aag gtc 1406  
10 Glu Ser Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val  
435 440 445

gga ccc att ggc agc acc ggc aac cct agc ggc ggc aac cct ccc ggc 1454  
Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly  
450 455 460

gga aac ccg cct ggc acc acc acc acc cgc cgc cca gcc act acc act 1502  
15 Gly Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr  
465 470 475

gga agc tct ccc gga cct acc cag tct cac tac ggc cag tgc ggc ggt 1550  
Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly  
20 480 485 490 495

att ggc tac agc ggc ccc acg gtc tgc gcc agc ggc aca act tgc cag 1598  
Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln  
500 505 510

gtc ctg aac cct tac tac tct cag tgc ctg taa 1631  
25 Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu  
515 520

<210> 28  
<211> 521  
<212> PRT  
30 <213> *Thermoascus aurantiacus*  
<400> 28

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

Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr  
 260 265 270  
 Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His  
 275 280 285  
 5 Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr  
 290 295 300  
 Val Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Thr Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln  
 10 325 330 335  
 Ser Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu  
 340 345 350  
 Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe  
 355 360 365  
 15 Thr His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met  
 370 375 380  
 Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val  
 20 405 410 415  
 Ala Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu  
 420 425 430  
 Ser Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly  
 435 440 445  
 25 Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly  
 450 455 460  
 Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly  
 465 470 475 480  
 Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile  
 30 485 490 495  
 Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val  
 500 505 510

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu

515

520

<210> 29

<211> 1734

5

<212> DNA

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<220>

<221> Intron

<222> (610)..(674)

10

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (1726)..(1731)

<223>

15

<220>

<221> CDS

<222> (675)..(1661)

<223>

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(609)

<223>

<220>

<221> Intron

25

<222> (1662)..(1725)

<223>

<400> 29

atg tat cag cgc gct ctt ctc ttc tct ttc ttc ctc gcc gcc gcc cgc

48

Met Tyr Gln Arg Ala Leu Leu Phe Ser Phe Phe Leu Ala Ala Ala Arg

30

1

5

10

15

gcg cag cag gcc ggt acc gta acc gca gag aat cac cct tcc ctg acc

96

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Ala | Gln | Gln | Ala | Gly | Thr | Val | Thr | Ala | Glu | Asn | His | Pro | Ser | Leu | Thr |     |
|    | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | tgg | cag | caa | tgc | tcc | agc | ggc | ggg | agt | tgt | acc | acg | cag | aat | gga | aaa | 144 |
|    | Trp | Gln | Gln | Cys | Ser | Ser | Gly | Gly | Ser | Cys | Thr | Thr | Gln | Asn | Gly | Lys |     |
| 5  | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | gtc | gtt | atc | gat | gcg | aac | tgg | cgt | tgg | gtc | cat | acc | acc | tct | gga | tac | 192 |
|    | Val | Val | Ile | Asp | Ala | Asn | Trp | Arg | Trp | Val | His | Thr | Thr | Ser | Gly | Tyr |     |
|    | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | acc | aac | tgc | tac | acg | ggc | aat | acg | tgg | gac | acc | agt | atc | tgt | ccc | gac | 240 |
| 10 | Thr | Asn | Cys | Tyr | Thr | Gly | Asn | Thr | Trp | Asp | Thr | Ser | Ile | Cys | Pro | Asp |     |
|    | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |     |
|    | gac | gtg | acc | tgc | gct | cag | aat | tgt | gcc | ttg | gat | gga | gcg | gat | tac | agt | 288 |
|    | Asp | Val | Thr | Cys | Ala | Gln | Asn | Cys | Ala | Leu | Asp | Gly | Ala | Asp | Tyr | Ser |     |
|    | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 15 | ggc | acc | tat | ggg | gtt | acg | acc | agt | ggc | aac | gcc | ctg | aga | ctg | aac | ttt | 336 |
|    | Gly | Thr | Tyr | Gly | Val | Thr | Thr | Ser | Gly | Asn | Ala | Leu | Arg | Leu | Asn | Phe |     |
|    | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | gtc | acc | caa | agc | tca | ggg | aag | aac | att | ggc | tgc | cgc | ctg | tac | ctg | ctg | 384 |
|    | Val | Thr | Gln | Ser | Ser | Gly | Lys | Asn | Ile | Gly | Ser | Arg | Leu | Tyr | Leu | Leu |     |
| 20 | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | cag | gac | gac | acc | act | tat | cag | atc | ttc | aag | ctg | ctg | ggg | cag | gag | ttt | 432 |
|    | Gln | Asp | Asp | Thr | Thr | Tyr | Gln | Ile | Phe | Lys | Leu | Leu | Gly | Gln | Glu | Phe |     |
|    | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |     |
|    | acc | ttc | gat | gtc | gac | gtc | tcc | aat | ctc | cct | tgc | ggg | ctg | aac | ggc | gcc | 480 |
| 25 | Thr | Phe | Asp | Val | Asp | Val | Ser | Asn | Leu | Pro | Cys | Gly | Leu | Asn | Gly | Ala |     |
|    | 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |     |
|    | ctc | tac | ttt | gtg | gcc | atg | gac | gcc | gac | ggc | gga | ttg | tcc | aaa | tac | cct | 528 |
|    | Leu | Tyr | Phe | Val | Ala | Met | Asp | Ala | Asp | Gly | Gly | Leu | Ser | Lys | Tyr | Pro |     |
|    | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 30 | ggc | aac | aag | gca | ggc | gct | aag | tat | ggc | act | ggg | tac | tgc | gac | tct | cag | 576 |
|    | Gly | Asn | Lys | Ala | Gly | Ala | Lys | Tyr | Gly | Thr | Gly | Tyr | Cys | Asp | Ser | Gln |     |
|    | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |     |

|    |                                                                   |      |
|----|-------------------------------------------------------------------|------|
|    | tgc cct cgg gat ctc aag ttc atc aac ggt cag gtacgtcaga agtgataact | 629  |
|    | Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln                       |      |
|    | 195 200                                                           |      |
|    | agccagcaga gcccatgaat cattaactaa cgctgtcaaa tacag gcc aat gtt gaa | 686  |
| 5  | Ala Asn Val Glu                                                   |      |
|    | 205                                                               |      |
|    | ggc tgg cag ccg tct gcc aac gac cca aat gcc ggc gtt ggt aac cac   | 734  |
|    | Gly Trp Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His   |      |
|    | 210 215 220                                                       |      |
| 10 | ggg tcc tgc tgc gct gag atg gat gtc tgg gaa gcc aac agc atc tct   | 782  |
|    | Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser   |      |
|    | 225 230 235                                                       |      |
|    | act gcg gtg acg cct cac cca tgc gac acc ccc ggc cag acc atg tgc   | 830  |
|    | Thr Ala Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys   |      |
| 15 | 240 245 250 255                                                   |      |
|    | cag gga gac gac tgt ggt gga acc tac tcc tcc act cga tat gct ggt   | 878  |
|    | Gln Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly   |      |
|    | 260 265 270                                                       |      |
|    | acc tgc gac cct gat ggc tgc gac ttc aat cct tac cgc cag ggc aac   | 926  |
| 20 | Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn   |      |
|    | 275 280 285                                                       |      |
|    | cac tcg ttc tac ggc ccc ggg cag atc gtc gac acc agc tcc aaa ttc   | 974  |
|    | His Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe   |      |
|    | 290 295 300                                                       |      |
| 25 | acc gtc gtc acc cag ttc atc acc gac gac ggg acc ccc tcc ggc acc   | 1022 |
|    | Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr   |      |
|    | 305 310 315                                                       |      |
|    | ctg acg gag atc aaa cgc ttc tac gtc cag aac ggc aag gta atc ccc   | 1070 |
|    | Leu Thr Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro   |      |
| 30 | 320 325 330 335                                                   |      |
|    | cag tcg gag tcg acg atc agc ggc gtc acc ggc aac tca atc acc acc   | 1118 |

|    |                                                                 |      |
|----|-----------------------------------------------------------------|------|
|    | Gln Ser Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr |      |
|    | 340 345 350                                                     |      |
|    | gag tat tgc acg gcc cag aag gcc gcc ttc ggc gac aac acc ggc ttc | 1166 |
|    | Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe |      |
| 5  | 355 360 365                                                     |      |
|    | ttc acg cac ggc ggg ctt cag aag atc agt cag gct ctg gct cag ggc | 1214 |
|    | Phe Thr His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly |      |
|    | 370 375 380                                                     |      |
|    | atg gtc ctc gtc atg agc ctg tgg gac gat cac gcc gcc aac atg ctc | 1262 |
| 10 | Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu |      |
|    | 385 390 395                                                     |      |
|    | tgg ctg gac agc acc tac ccg act gat gcg gac ccg gac acc cct ggc | 1310 |
|    | Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly |      |
|    | 400 405 410 415                                                 |      |
| 15 | gtc gcg cgc ggt acc tgc ccc acg acc tcc ggc gtc ccg gcc gac gtt | 1358 |
|    | Val Ala Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val |      |
|    | 420 425 430                                                     |      |
|    | gag tcg cag tac ccc aat tca tat gtt atc tac tcc aac atc aag gtc | 1406 |
|    | Glu Ser Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val |      |
| 20 | 435 440 445                                                     |      |
|    | gga ccc atc ggc tcg acc gtc cct ggc ctt gac ggc agc aac ccc ggc | 1454 |
|    | Gly Pro Ile Gly Ser Thr Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly |      |
|    | 450 455 460                                                     |      |
|    | aac ccg acc acc acc gtc gtt cct ccc gct tct acc tcc acc tcc cgt | 1502 |
| 25 | Asn Pro Thr Thr Thr Val Val Pro Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg |      |
|    | 465 470 475                                                     |      |
|    | ccg acc agc agc act agc tct ccc gtt tcg acc ccg act ggc cag ccc | 1550 |
|    | Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro |      |
|    | 480 485 490 495                                                 |      |
| 30 | ggc ggc tgc acc acc cag aag tgg ggc cag tgc ggc ggt atc ggc tac | 1598 |
|    | Gly Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr |      |
|    | 500 505 510                                                     |      |

acc ggc tgc act aac tgc gtt gct ggc acc acc tgc act cag ctc aac 1646  
 Thr Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn  
 515 520 525

ccc tgg tac agc cag gtatgtttct cttccccctt ctagactcgc ttggatttga 1701  
 5 Pro Trp Tyr Ser Gln  
 530

cagttgctaa catctgctca acag tgc ctg taa 1734  
 Cys Leu

<210> 30  
 10 <211> 534  
 <212> PRT  
 <213> *Thermoascus aurantiacus*  
 <400> 30

Met Tyr Gln Arg Ala Leu Leu Phe Ser Phe Phe Leu Ala Ala Ala Arg  
 15 1 5 10 15  
 Ala Gln Gln Ala Gly Thr Val Thr Ala Glu Asn His Pro Ser Leu Thr  
 20 25 30  
 Trp Gln Gln Cys Ser Ser Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys  
 35 40 45

20 Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Thr Thr Ser Gly Tyr  
 50 55 60  
 Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Thr Ser Ile Cys Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Val Thr Cys Ala Gln Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser  
 25 85 90 95  
 Gly Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ala Leu Arg Leu Asn Phe  
 100 105 110  
 Val Thr Gln Ser Ser Gly Lys Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Leu  
 115 120 125

30 Gln Asp Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Gly Gln Glu Phe  
 130 135 140

Thr Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Leu Ser Lys Tyr Pro  
 165 170 175  
 5 Gly Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln  
 180 185 190  
 Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly  
 195 200 205  
 Trp Gln Pro Ser Ala Asn Asp Pro Asn Ala Gly Val Gly Asn His Gly  
 10 210 215 220  
 Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp Val Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr  
 225 230 235 240  
 Ala Val Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro Gly Gln Thr Met Cys Gln  
 245 250 255  
 15 Gly Asp Asp Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Thr  
 260 265 270  
 Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro Tyr Arg Gln Gly Asn His  
 275 280 285  
 Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser Lys Phe Thr  
 20 290 295 300  
 Val Val Thr Gln Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Pro Ser Gly Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Thr Glu Ile Lys Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Gln  
 325 330 335  
 25 Ser Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu  
 340 345 350  
 Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ala Ala Phe Gly Asp Asn Thr Gly Phe Phe  
 355 360 365  
 Thr His Gly Gly Leu Gln Lys Ile Ser Gln Ala Leu Ala Gln Gly Met  
 30 370 375 380  
 Val Leu Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala Asn Met Leu Trp  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asp Ala Asp Pro Asp Thr Pro Gly Val  
                     405                    410                    415  
 Ala Arg Gly Thr Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu  
                     420                    425                    430  
**5** Ser Gln Tyr Pro Asn Ser Tyr Val Ile Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly  
                     435                    440                    445  
 Pro Ile Gly Ser Thr Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Asn Pro Gly Asn  
                     450                    455                    460  
 Pro Thr Thr Thr Val Val Pro Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser Arg Pro  
**10** 465                    470                    475                    480  
 Thr Ser Ser Thr Ser Ser Pro Val Ser Thr Pro Thr Gly Gln Pro Gly  
                     485                    490                    495  
 Gly Cys Thr Thr Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr  
                     500                    505                    510  
**15** Gly Cys Thr Asn Cys Val Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gln Leu Asn Pro  
                     515                    520                    525  
 Trp Tyr Ser Gln Cys Leu  
                     530

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Primalco Ltd, Biotec  
Valta-akseli  
Fin-05200 Rajamaki

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                                                     | II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Nome: Primalco Ltd, Biotec</p> <p>Endereço: Valta-akseli<br/>Fin-05200 Rajamaki</p>                                                                                                                                                             | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>CBS 730.95</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>Quarta-feira, 8 de novembro de 1995</p> |
| <p><b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b></p>                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                 |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testado na segunda-feira, 20 de novembro de 1995 <sup>2</sup>.</p> <p>Nessa data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                                 |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data.

relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), referem-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável..

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Primalco Ltd, Biotec  
Valta-akseli  
05200 Rajamaki  
Finland

Recibo no caso de um original, e-  
mitido por força da regra 7.1 pela  
autoridade internacional de depósi-  
to identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                      |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br>ALKO4265                                                                                                                                                                                                                                         | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br>CBS 730.95                                                                                               |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                      |
| <p>O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:</p> <p><input type="checkbox"/> uma descrição científica</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta</p> <p>(Marcar com um x quando aplicável)</p>                                                            |                                                                                                                                                                                      |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                      |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido na quarta-feira 8 de novembro de 1995 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                          |                                                                                                                                                                                      |
| <b>IV. RECIBO DO REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                      |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                                      |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                      |
| <p>Nome: Centraalbureau voor Schimmelcultures</p> <p>Endereço: Oosterstraat 1</p> <p>P.O. Box 273</p> <p>3740 AG BAARN</p> <p>The Netherlands</p>                                                                                                                                                           | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p>Segunda, 20 de novembro de 1995</p> |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes

FORMATO INTERNACIONAL

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
05200 RAJAMÄKI  
Finland

DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO  
identificada abaixo

| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                          | II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>05200 RAJAMÄKI<br/>Finland</p>                                                                                                                                    | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>CBS 116239</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>20-09-2004</p> |
| <p>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</p>                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                        |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 24-09-2004 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                        |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável..

|                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup>                                                                                                |                                                                                                                                                                           |
|                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                           |
| V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                           |
| Nome: Centraalbureau voor Schimmelcultures<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço : Uppsalalaan 8<br>P.O. Box 85167<br>3508 Adutrrecht<br>The Netherlands | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo<br>o poder de representação da autori-<br>dade Internacional de Depósito ou<br>de oficial(is) responsável(is)<br><br>Data: 30-09-2004 |

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

05200 Rajamäki

Finland

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                      |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br>ALKO4242                                                                                                                                                                                                                                         | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br>CBS 116239                                                                               |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                      |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                      |
| <input type="checkbox"/> uma descrição científica<br><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta<br>(Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                      |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                      |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido na quarta-feira 20-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                     |                                                                                                                                                                      |
| <b>IV. RECIBO DO REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                      |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                      |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                      |
| Nome: Centraalbureau voor Schimmelcultures<br>Endereço: Uppsalalaan 8<br><br>P.O. Box 85167<br>3508 AD UTRECHT<br><br>The Netherlands                                                                                                                                                                       | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br><br><br>30-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

**Roal Oy**  
**Tykkimäentie 15**  
**05200 RAJAMÄKI**  
**Finland**

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
 Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
 identificada abaixo

| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                                              | II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Nome:</b>     Roal Oy</p> <p><b>Endereço:</b> Tykkimäentie 15<br/>                                      05200 RAJAMÄKI<br/>                                      Finland</p>                                                          | <p>Número de acesso fornecido pela<br/> <b>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b><br/>                                      CBS 116240<br/>                                      Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>                                                              20-09-2004</p> |
| III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 24-09-2004 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>      ( X )<sup>3</sup>    viável</p> <p>      (   )<sup>3</sup>    inviável</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

|                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup>                                                                        |                                                                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                              |
| V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO                                                                                                             |                                                                                                                                                                              |
| <p>Nome: Centraalbureau voor Schimmelcultures</p><br><br><p>Endereço : Uppsalalaan 8<br/>P.O. Box 85167<br/>3508 AD UTRECHT<br/>The Netherlands</p> | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p><br><br><p>Data: 30-09-2004</p> |

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de  
microorganismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

05200 Rajamäki

Finland

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                               |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br>ALKO4245                                                                                                                                                                                                                                         | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br>CBS 116240                                                                                        |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                               |
| <p>O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:</p> <p><input type="checkbox"/> uma descrição científica</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta</p> <p>(Marcar com um x quando aplicável)</p>                                                            |                                                                                                                                                                               |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                               |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 20-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                               |
| <b>IV. RECIBO DO REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                               |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                               |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                               |
| <p>Nome: Centraalbureau voor Schimmelcultures</p> <p>Endereço: Uppsalalaan 8</p> <p>P.O. Box 85167</p> <p>3508 AD UTRECHT</p> <p>The Netherlands</p>                                                                                                                                                        | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">30-09-2004</p> |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Roal Oy**  
**Tykkimäentie 15**  
**05200 RAJAMÄKI**  
**Finland**

Emitido por força da regra 10.2 pela

**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**

identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                                                                            |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  | II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO                                                                                                                                                                        |  |
| Nome: Roal Oy<br>Endereço: Tykkimäentie 15<br>05200 RAJAMÄKI<br>Finland                                                                                                                                                                                                                              |  | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br>DSM 16723<br>Data do depósito ou da transferência <sup>1</sup> :<br>16-09-2004                                                  |  |
| III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |                                                                                                                                                                                                            |  |
| A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 16-09-2004 <sup>2</sup> .<br>Nesta data, o referido microorganismo foi<br><br><div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>( X )<sup>3</sup> viável</span> <span>( )<sup>3</sup> inviável</span> </div> |  |                                                                                                                                                                                                            |  |
| IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup>                                                                                                                                                                                                                         |  |                                                                                                                                                                                                            |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                                                                                                                                                                                            |  |
| V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO                                                                                                                                                                                                                                                              |  |                                                                                                                                                                                                            |  |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHESAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço : Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                |  | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br>poder de representação da autoridade<br>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><div style="text-align: right;">Data: 17-09-2004</div> |  |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de microorganismo para fins de processamento de matéria de patentes

FORMATO INTERNACIONAL

Roal Oy

Tykkimäentie 15

05200 Rajamäki

Finland

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                    |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5738                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 16723                                                                          |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 16-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                    |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                    |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                    |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHESAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                    | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>17-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes

FORMATO INTERNACIONAL

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
05200 RAJAMÄKI  
Finland

DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                          | II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO                                                                                                                                           |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>05200 RAJAMÄKI<br/>Finland</p>                                                                                                                                    | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 16728</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>16-09-2004</p>         |
| III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                               |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 16-09-2004 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                               |
| IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup>                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                               |
| V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                               |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                          | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p>Data: 17-09-2004</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

05200 Rajamäki

Finland

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                    |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5825                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 16728                                                                          |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 16-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                    |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                    |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                    |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>17-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de  
microorganismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
05200 RAJAMÄKI  
Finland

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                  | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>05200 RAJAMÄKI<br/>Finland</p>                                                                                                                                   | <p>Número de acesso fornecido pela<br/><b>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b><br/>DSM 16729</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>16-09-2004</p>                |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 16-09-2004<sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO<sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHESAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                          | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 17-09-2004</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

05200 Rajamäki

Finland

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                    |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5834                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 16729                                                                          |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 16-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                    |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                    |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                    |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>17-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de  
microorganismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
05200 RAJAMÄKI  
Finland

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                               | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>05200 RAJAMÄKI<br/>Finland</p>                                                                                                                                | <p>Número de acesso fornecido pela<br/><b>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b><br/>DSM 16727</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>16-09-2004</p>                |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 16-09-2004<sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável<br/>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO<sup>4</sup></b>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                      | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 17-09-2004</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

05200 Rajamäki

Finland

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                    |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5821                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 16727                                                                          |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 16-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                    |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                    |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                    |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>17-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de  
microorganismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                            | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 17326</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>13-05-2005</p>                       |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 13-05-2005 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                          | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 19-05-2005</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                         |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF6098                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 17326                                                                                               |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                         |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica.<br><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta<br>(Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                         |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                         |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 13-05-2005 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                         |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                         |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                                         |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                         |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><div align="right">19-05-2005</div> |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de  
microorganismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**

identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                            | <p>Número de acesso fornecido pela<br/><b>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b><br/>DSM 17324</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>13-05-2005</p>                |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 13-05-2005 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                          | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 19-05-2005</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                    |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5935                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 17324                                                                          |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                    |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 13-05-2005 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                    |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                    |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                    |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                    |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>19-05-2005 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de  
microorganismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                            | <p>Número de acesso fornecido pela<br/><b>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b><br/>DSM 17323</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>13-05-2005</p>                |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 13-05-2005 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROOGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                           | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 19-05-2005</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                      |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5924                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 17323                                                                            |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                      |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica<br><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta<br>(Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                      |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                      |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 13-05-2005 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                      |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                      |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                      |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                      |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                       | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br>Data: 19-05-2005 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                            | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 17729</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>18-11-2005</p>                       |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 18-11-2005 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                          | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 22-11-2005</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                          |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF6435                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 17729                                                                                |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica.                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 18-11-2005 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                          |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                          |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>Data: 22-11-2005 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
05200 RAJAMÄKI  
Finland

DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>05200 RAJAMÄKI<br/>Finland</p>                                                                                                                                    | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 16724</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>16-09-2004</p>                       |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 16-09-2004 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                          | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 17-09-2004</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

05200 Rajamäki

Finland

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                          |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5805                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 16724                                                                                |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica.                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 16-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                          |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                          |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>Data: 17-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                  | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                    |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                           | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 16726</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>16-09-2004</p>         |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                               |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 16-09-2004<sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                               |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO<sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                               |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                               |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                         | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p>Data: 17-09-2004</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                          |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5812                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 16726                                                                                |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:<br><input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica.<br><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta<br>(Marcar com um x quando aplicável)                                                                   |                                                                                                                                                                          |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 16-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                          |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                          |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>Data: 17-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                            | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 16725</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>16-09-2004</p>                       |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 16-09-2004 <sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                          | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 17-09-2004</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                          |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF5811                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 16725                                                                                |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica<br><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta<br>(Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                          |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 16-09-2004 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                          |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                          |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>Data: 17-09-2004 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. DEPOSITANTE</b>                                                                                                                                                                                                  | <b>II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                  |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                           | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 17325</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>13-05-2005</p>                       |
| <b>III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                             |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 13-05-2005<sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                                             |
| <b>IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO<sup>4</sup></b>                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                             |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                             |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                         | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p align="right">Data: 19-05-2005</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                          |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF6077                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 17325                                                                                |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica<br><input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta<br>(Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                          |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 13-05-2005 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                          |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                          |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>Data: 19-05-2005 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes

FORMATO INTERNACIONAL

Roal Oy  
Tykkimäentie 15  
Fin-05200 RAJAMÄKI

DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I. DEPOSITANTE                                                                                                                                                                                                         | II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO                                                                                                                                           |
| <p>Nome: Roal Oy</p> <p>Endereço: Tykkimäentie 15<br/>Fin-05200 RAJAMÄKI</p>                                                                                                                                           | <p>Número de acesso fornecido pela<br/>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO<br/>DSM 17667</p> <p>Data do depósito ou da transferência<sup>1</sup>:<br/>18-10-2005</p>         |
| III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                               |
| <p>A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testada em 18-10-2005<sup>2</sup>.</p> <p>Nesta data, o referido microorganismo foi</p> <p>( X )<sup>3</sup> viável</p> <p>( )<sup>3</sup> inviável</p> |                                                                                                                                                                               |
| IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO <sup>4</sup>                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                               |
| V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                               |
| <p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br/>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br/>D-38124 Braunschweig</p>                                                                         | <p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o<br/>poder de representação da autoridade<br/>Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)</p> <p>Data: 19-10-2005</p> |

<sup>1</sup> Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), refere-se ao teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um X o campo aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se a informação foi requerida e se os resultados do teste foram negativos.

**Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de micro-organismo para fins de processamento de matéria de patentes**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Roal Oy

Tykkimäentie 15

Fin-05200 Rajamäki

Recibo no caso de um original, emitido por força da regra 7.1 pela autoridade internacional de depósito identificada abaixo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                          |
| Referência de identificação fornecida pelo depositante:<br><br>RF6267                                                                                                                                                                                                                                       | Número de acesso fornecido pela<br>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:<br><br>DSM 17667                                                                                |
| <b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por:                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> uma descrição científica                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> designação taxonômica proposta                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |
| (Marcar com um x quando aplicável)                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                          |
| <b>III. RECIBO DE ACEITAÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                          |
| A presente autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 18-10-2005 (data do depósito original) <sup>1</sup>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                          |
| <b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                          |
| O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão). |                                                                                                                                                                          |
| <b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                          |
| Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON<br>MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH<br><br>Endereço: Mascheroder Weg 1b<br><br>D-38124 Braunschweig                                                                                                                                                                   | Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder<br>de representação da Autoridade Internacional<br>de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)<br><br><br>Data: 19-10-2005 |

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4(d), a referida data é a data na qual o status da autoridade Internacional de depósito foi obtido.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar material celulósico, caracterizado pelo fato de que é com celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosidase, pelo que a dita celobioidrolase compreende uma seqüência de aminoácido possuindo  
5 pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 2, 4, 6 ou 8, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a celobioidrolase é obtida de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*.

10 3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a celobioidrolase é obtida de CBS 116239 de *Thermoascus aurantiacus*, CBS 116240 de *Acremonium thermophilum*, ou CBS 730.95 de *Chaetomium thermophilum*.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo  
15 fato de que as enzimas recombinantes são usadas, preferivelmente produzidas em uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que compreende o emprego de uma celobioidrolase obtida de *Thermoascus aurantiacus* ou *Acremonium thermophilum* aos quais um domínio  
20 de ligação de celulose foi anexado geneticamente.

6. Método de acordo com a reivindicação 5; caracterizado pelo fato de que o domínio de ligação de celulose anexado é derivado de *Trichoderma reesei* ou *Chaetomium termophilum*, e preferivelmente a proteína de fusão resultante compreende uma seqüência de aminoácido possuindo pelo  
25 menos 80% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 28 ou 30.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a endoglicanase compreende uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 10, 12, 14 ou 16, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

30 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a endoglicanase pode ser obtida de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a endoglicanase pode ser obtida de CBS 116239 de *Thermoascus aurantiacus*, CBS 116240 de *Acremonium thermophilum* ou CBS 730.95 de *Chaetomium thermophilum*.

5                   10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a beta-glicosidase compreende uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 22, 24 ou 26, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

10                   11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a beta-glicosidase é obtida de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum*, ou *Chaetomium thermophilum*, preferivelmente de CBS 116239 de *Thermoascus aurantiacus*, CBS 116240 de *Acremonium thermophilum*, ou CBS 730.95 *Chaetomium thermophilum*.

15                   12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o material celulósico é material lignocelulósico.

20                   13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende tratamento do material lignocelulósico com pelo menos uma enzima adicional, preferivelmente uma xilanase, que compreende, preferivelmente uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID Nº: 18 ou 20, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

25                   14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a xilanase é obtida de *Thermoascus aurantiacus* ou *Acremonium thermophilum*, preferivelmente de CBS 116239 *Thermoascus aurantiacus* ou CBS 116240 de *Acremonium thermophilum*.

                    15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que as enzimas são adicionadas ao material celulósico tanto simultânea quanto seqüencialmente.

30                   16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma das enzimas é codificada por um gene semelhante aquele incluído em um microorganismo possu-

indo número de acesso DSM 16723, DSM 16728, DSM 16729, DSM 16727, DSM 17326, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16724, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

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

18. Preparação de enzima, caracterizada pelo fato de que compreende celobioidrolase, endoglicanase e beta-glicosidase, caracterizado pelo fato de que a dita celobioidrolase compreende uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID N°: 2, 4, 6 ou 8, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

19. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a dita celobioidrolase é obtida de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum* ou *Chaetomium thermophilum*.

20. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a celobioidrolase é obtida de CBS 116239 de *Thermoascus aurantiacus*, CBS 116240 de *Acremonium thermophilum* ou CBS 730.95 de *Chaetomium thermophilum*.

21. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que as enzimas são enzimas recombinantes, preferivelmente produzidas em uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

22. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que compreende uma celobioidrolase obtida de *Thermoascus aurantiacus* à qual um domínio de ligação de celulose foi anexado geneticamente.

23. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que o domínio de ligação de celulose anexado é derivado de *Trichoderma reesei* ou *Chaetomium termophilum*, e preferivel-

mente a proteína de fusão resultante compreende uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID N°: 28 ou 30.

24. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a endoglicanase compreende uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID N°: 10, 12, 14 ou 16, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

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

26. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a beta-glucosidase compreende uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID N°: 22, 24 ou 26, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

27. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que a beta-glucosidase é obtida de *Thermoascus aurantiacus*, *Acremonium thermophilum*, ou *Chaetomium thermophilum*, preferivelmente de CBS 116239 de *Thermoascus aurantiacus*, CBS 116240 de *Acremonium thermophilum* ou CBS 730.95 de *Chaetomium thermophilum*.

28. Preparação de enzima de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos uma enzima adicional, preferivelmente uma xilanase, que compreende, preferivelmente, uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID N°: 18 ou 20, ou com relação a um fragmento enzimaticamente ativo da mesma.

29. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que a xilanase é obtida de *Thermoascus aurantiacus* ou *Acremonium thermophilum*, preferivelmente de CBS 116239 de

*Thermoascus aurantiacus* ou CBS 116240 de *Acremonium thermophilum*.

30. Preparação de enzima de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma das enzimas é codificada por um gene semelhante aquele incluído em um microorganismo possuindo número de acesso DSM 16723, DSM 16728, DSM 16729, DSM 16727, DSM 17326, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16724, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 ou DSM 17667.

31. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que está na forma de meio de cultura gasto, pós, grânulos ou líquidos.

32. Uso de uma preparação de enzima como definida em qualquer uma das reivindicações 18 a 31, caracterizado pelo fato de que é para degradação de material celulósico.

33. Uso de acordo com reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o material celulósico é selecionado do grupo consistindo em palha de milho, gramínea do tipo switchgrass nativa da América do Norte, palha de cereais, bagaço de cana de açúcar e materiais derivados de madeira.

34. Uso do método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que é um processo para preparação de etanol a partir de material celulósico.

35. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende um fragmento possuindo atividade celulósica e sendo selecionado do grupo consistindo em:

a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido possuindo pelo menos 66% de identidade com relação à SEQ ID N°:4, 79% de identidade com relação à SEQ ID N°:6, 78% de identidade com relação à SEQ ID N°:12, 68% de identidade com relação à SEQ ID N°:14, 72% de identidade com relação à SEQ ID N°:16, 68% de identidade com relação à SEQ ID N°:20, 74% de identidade com relação à SEQ ID N°:22 ou 24, ou 78% de identidade com relação à SEQ ID N°:26;

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

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

36. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 a) uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 80% de identidade com relação à SEQ ID N<sup>o</sup>: 4, 6, 12, 14, 16, 20, 22, 24 ou 26;

b) uma variante de a) compreendendo um fragmento possuindo atividade de celobioidrolase, endoglicanase, xilanase ou beta-glicosidase; ou

c) um fragmento de a) ou b) possuindo atividade de celobioidrolase, endoglicanase, xilanase ou beta-glicosidase.

10 37. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo consistindo em:

a) uma seqüência de nucleotídeo da SEQ ID N<sup>o</sup>: 3, 5, 11, 13, 15, 19, 21, 23 ou 25, ou uma seqüência codificando um polipeptídeo da reivindicação 35;

15 b) um filamento complementar de a)

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

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

38. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que possui uma seqüência compreendida das SEQ ID N<sup>os</sup>: 3, 5, 11, 13, 15, 19, 21, 23 ou 25.

25 39. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que compreende um gene similar ao incluindo em um microorganismo possuindo número de acesso selecionado do grupo consistindo em DSM 16728, DSM 16729, DSM 17324, DSM 17323, DSM 17729, DSM 16726, DSM 16725, DSM 17325 e DSM 17667.

30 40. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende como uma seqüência heteróloga um polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 37 a 39.

41. Vetor de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo

fato de que é capaz de expressar um polipeptídeo como definido na reivindicação 35.

42. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor como definido na reivindicação 40.

5 43. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que é capaz de expressar o polipeptídeo codificado pela sequência de polinucleotídeo heteróloga.

44. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que é uma cepa do gênero *Trichoderma* ou *Aspergillus*.

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

46. Preparação de enzima, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido na reivindicação 35.

15 47. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 46, caracterizada pelo fato de que está na forma de meio de cultura gasto, pó, grânulos ou líquido.

48. Preparação de enzima de acordo com a reivindicação 46 ou 47, caracterizada pelo fato de que compreende atividade de celobioidrolase, endoglicanase, beta-glicosidase, e opcionalmente de xilanase e/ou atividade de outras enzimas.

20

49. Preparação da enzima de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 48, caracterizada pelo fato de que compreende, adicionalmente, aditivos convencionais.

25 50. Uso de um polipeptídeo como definido na reivindicação 35, ou uma preparação de enzima como definida na reivindicação 46, caracterizada pelo fato de que é na indústria de combustíveis, têxteis, detergentes, polpa e papel, alimentos, suplementos ou bebidas.

51. Uso de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo  
30 fato de que a enzima é empregada no tratamento de polpa kraft, polpa mecânica ou papel reciclado.

52. Uso de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo

fato de que a preparação de enzima é meio de cultura gasto.

53. Método para preparar um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende um fragmento possuindo atividade celulósica e sendo selecionado do grupo consistindo em:

- 5 a) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 66% de identidade com relação à SEQ ID N°:4, 79% de identidade com relação à SEQ ID N°:6, 78% de identidade com relação à SEQ ID N°:12, 68% de identidade com relação à SEQ ID N°:14, 72% de identidade com relação à SEQ ID N°:16, 68% de identidade com relação à SEQ ID N°:20, 74% de identidade com relação à SEQ ID N°:22 ou 24, ou 78% de identidade com relação à SEQ ID N°:26;

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

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

20 54. Método para tratar material celulósico, caracterizado pelo fato de que é com um meio de cultura gasto de pelo menos um microorganismo capaz de produzir um polipeptídeo compreendendo um fragmento possuindo atividade celulósica e sendo selecionado do grupo consistindo em:

- 25 a) um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido possuindo pelo menos 66% de identidade com relação à SEQ ID N°:4, 79% de identidade com relação à SEQ ID N°:6, 78% de identidade com relação à SEQ ID N°:12, 68% de identidade com relação à SEQ ID N°:14, 72% de identidade com relação à SEQ ID N°:16, 68% de identidade com relação à SEQ ID N°:20, 74% de identidade com relação à SEQ ID N°:22 ou 24, ou 78% de identidade com relação à SEQ ID N°:26;

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

- c) um fragmento de a) ou b) possuindo atividade celulósica,

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

# RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA TRATAR MATERIAL CELULÓSICO, USO DO MESMO, PREPARAÇÃO DE ENZIMA, USO DA MESMA, POLIPEPTÍDEO, USO E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DO MESMO".

- 5                   A presente invenção refere-se à produção de hidrolases de açúcar a partir de material celulósico. O método pode ser usado, por exemplo, para produzir açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico. São descritas as enzimas lignocelulósicas e sua
- 10               produção por tecnologia recombinante, bem como os usos das enzimas e preparações de enzima.