



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

(21) PI 1009488-1 A2



(22) Data do Depósito: 16/03/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 23/09/2010

(54) Título: NOVO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE FUNGOS

(51) Int. Cl.: C12N 15/00; C12N 15/09; C12P 21/02; C12R 1/645.

(30) Prioridade Unionista: 16/03/2009 EP EP 09003750.

(71) Depositante(es): DYADIC NEDERLAND B.V..

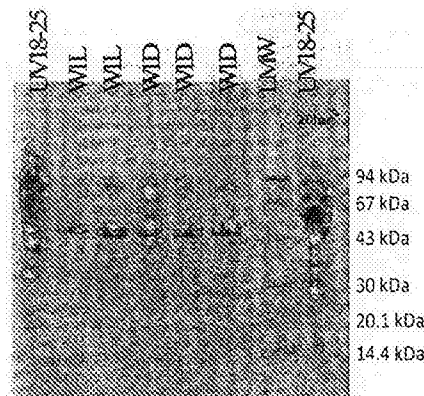
(72) Inventor(es): PETER J. PUNT; RICHARD PAUL BURLINGAME; CHRISTINE M. PYNNONEN; PHILLIP T. OLSON; JAN WERY; JOHANNES HEINRICH VISSER; MARK A. EMALFARB; JACOB VISSER.

(86) Pedido PCT: PCT NL2010000045 de 16/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/107303 de 23/09/2010

(85) Data da Fase Nacional: 15/09/2011

(57) Resumo: NOVO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE FUNGOS A presente invenção fornece um novo sistema de produção de fungos que compreende uma cepa de fungos hospedeiros de *Chrysosporium lucknowense* onde a secreção endógena de celulase é inferior a 20% da secreção endógena de celulase de *Chrysosporium lucknowense* cepa 18-25 UV. Preferencialmente, ainda a secreção de protease endógena, 3-glucanase endógena e celobiohidrolase endógena é inferior a 20% da secreção de *Chrysosporium lucknowense* cepa 18-25 UV. Além disso, cepas fúngicas hospedeiras são fornecidas onde vários genes foram interrompidos. De acordo com outro aspecto da invenção um método para produção homóloga e/ou heteróloga de uma proteína pura com uma pureza superior a 75%, que compreende expressar um gene que codifica dita proteína em uma cepa de acordo com a invenção foi descrito. Além disso, um método para a produção de misturas de proteínas artificiais compreendendo a expressão de genes que codificam cada uma de ditas proteínas em uma cepa de acordo com a invenção foi revelado. Finalmente, um método para triagem simplificada de cepas que funcionalmente expressam uma enzima desejada pela aplicação de ditas cepas foi fornecido.



## “SISTEMA DE PRODUÇÃO DE FUNGOS”

A presente invenção se refere a uma cepa de fungos hospedeiros de *Chrysosporium lucknowense*. A invenção refere-se ainda a um método para a produção de homólogos e/ou heterólogos de uma proteína pura, com uma pureza maior do que 75%, a um método  
5 para a produção de misturas de proteína artificial e a um método para triagem simplificada de cepas que expressam funcionalmente uma enzima desejada. A invenção refere-se ainda a uma sequência promotora isolada, apropriada para o controle transcricional da expressão gênica em *Chrysosporium lucknowense* e a um método para isolar uma cepa de fungos hospedeiros de *Chrysosporium lucknowense* onde a secreção de protease é inferior a 20%  
10 da secreção de protease de *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25.

Tem sido demonstrado que os fungos são excelentes para a produção de uma variedade de enzimas. Cepas como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e, recentemente, o fungo *Chrysosporium lucknowense* C1, foram aplicados na produção industrial de uma ampla variedade de enzimas. Cepas super-produtoras têm sido desenvolvidas e que secretam  
15 até 100 g/L ou mais de proteína no caldo de fermentação (vide, por exemplo, Hans Visser et al. Abstracts, J. of Biotechnology, S211-S241 (2007)). A grande capacidade de secretar proteínas destes fungos os tornam hospedeiros preferenciais para a produção direcionada de enzimas específicas ou misturas de enzimas. No entanto, normalmente, estes hospedeiros secretam uma mistura de várias enzimas diferentes, criando o produto de proteína bruta  
20 indefinida e produzindo, além da atividade da enzima desejada, uma série de atividades não-relevantes ou mesmo contra-produtivas. Isto ainda é verdade para o uso de tais fungos hospedeiros para a produção de atividades de enzimas específicas por super-expressão de genes selecionados através de várias abordagens de modificação genética. Também nestes casos a enzima alvo constituirá somente uma pequena parte do total de proteínas secretadas.  
25

Um sistema de produção microbiana capaz de secretar grandes quantidades de uma enzima específica, sem a presença de altos níveis de outras proteínas seria altamente desejável. Isto permitiria a triagem simplificada de hospedeiros que expressam funcionalmente uma enzima desejada. Isto possibilitaria a produção da enzima relativamente pura.  
30 Isto também permitiria a purificação simplificada em larga escala da enzima desejada. Estas vantagens contribuiriam enormemente para, por exemplo, a geração fácil de misturas de enzimas artificiais adaptadas para diferentes aplicações, por exemplo, hidrólise da biomassa vegetal (biocombustíveis e produtos químicos), acabamentos têxteis, aplicações na indústria de papel e celulose.

35 A produção relativamente limpa de enzimas extracelulares específicas a altos níveis por microorganismos que não secretam intrinsecamente altos níveis de proteína seria uma abordagem não preferencial. A capacidade limitada de secreção de enzimas de tais orga-

nismos impediria a produção de alto nível da enzima de interesse. O objeto da presente invenção compreende o isolamento de mutantes de uma cepa de fungos com alta capacidade de secreção que inesperadamente deixou de produzir níveis altos de muitas proteínas não desejadas, enquanto mantém boas características de crescimento, e receptividade à modificação genética. Estas cepas mutantes poderiam ser capazes de funcionar como um hospedeiro para alto nível de produção de enzimas específicas. A fim de alcançar o objeto pretendido da invenção, a invenção fornece uma cepa de fungo hospedeiro de *Chrysosporium lucknowense* onde a secreção de celulase endógena é inferior a 20% da secreção endógena de celulase de *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25, preferencialmente menos do que 15%, mais preferencialmente menos do que 10%, especificamente menos do que 5%, mais especificamente menos do que 2%, mais especificamente menos do que 1%, mais especificamente menos do que 1%, mais especificamente menos do que 0,5% ou menos do que 0,1%. A cepa *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25 foi descrita no pedido internacional de patente WO 0020555. Preferencialmente, a secreção de um ou mais do grupo que consiste de protease endógena,  $\beta$ -glucanase endógena e celobiohidrolase endógena da cepa de fungo hospedeiro de acordo com a invenção é menos do que 20%, mais preferencialmente menos do que 15%, mais preferencialmente menos do que 10%, especificamente menos do que 5%, mais especificamente menos do que 1% mais especificamente menos do que 0,5% ou 0,1% da secreção da protease endógena,  $\beta$ -glucanase endógena e celobiohidrolase endógena respectivamente de *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25. Todos os percentuais mencionados se aplicam à secreção de protease,  $\beta$ -glucanase e celobiohidrolase independentemente. Preferencialmente as cepas de acordo com a presente invenção são ainda caracterizadas de modo que a secreção de celobiohidrolase endógena 1 (Cbhl) esteja ausente. Mais preferencialmente, a cepa de acordo com a presente invenção é W1L, depositado em Centraal Bureau Schimmelcultures (CBS) sob número de acesso 122189 ou W1L#100.1 depositado no CBS sob o número de acesso 122190. Mais preferencialmente a partir das cepas, de acordo com a presente invenção, o gene que codifica endoquitinase 1 (*chi1*) foi interrompido. Mais preferencialmente, um ou mais genes selecionados do grupo que consiste destes que codificam protease alcalina 1 (*alp 1*), protease alcalina 2 (*alp2*), proteinase A (*pep4*),  $\beta$ -glucanase (*Gla1*), exo-quitinase (*Chi2*) e laminarinase (*Lam1*) foram interrompidos. Especialmente, as cepas de acordo com a invenção são W1L#100.1 $\Delta$ alpi $\Delta$ pyr5 ou W1L#100.1 $\Delta$ alpi $\Delta$ chl $\Delta$ pyr5. A invenção ainda refere-se a um método para produção homóloga e/ou heteróloga de uma proteína pura com uma pureza superior a 75 %, preferencialmente superior a 80%, mais preferencialmente superior a 85, 90 ou 95%, que compreende expressar um gene que codifica dita proteína em uma cepa de acordo com a invenção. Especialmente a invenção fornece um método para a produção de misturas de proteínas artificiais compreendendo a expressão de genes que codificam cada uma

de ditas proteínas da mistura em uma cepa de acordo com a invenção. Desta forma misturas de proteínas podem ser preparadas para diferentes aplicações, por exemplo, hidrólise de biomassa vegetal (biocombustíveis e produtos químicos), acabamentos têxteis, aplicações na indústria de papel e celulose. Além disso, a invenção fornece um método para a triagem simplificada de cepas que expressam funcionalmente uma enzima desejada pela aplicação das cepas de acordo com a presente invenção. De acordo com outro aspecto da invenção, uma sequência promotora isolada é fornecida de forma apropriada para o controle transcricional de expressão gênica em *Chrysosporium lucknowense*, selecionado do grupo que consiste de:

- a. o promotor *chi1* (0,8) compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 25,
  - b. o promotor *chi1* (1,8) compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 26,
  - c. o promotor *hex1* compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 27,
  - d. o promotor *xy16* compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 28,
  - e. o promotor *gla* compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 29
- ou uma parte transcricionalmente ativa do mesmo.

Ainda um gene quimérico compreendendo dita sequência promotora e hospedeiro compreendendo dito promotor e o gene quimérico são fornecidos pela presente invenção.

Finalmente foi fornecido um método para isolar uma cepa de fungos hospedeiros de *Chrysosporium lucknowense* onde a secreção de celulase e a protease é inferior a 20% da secreção de celulase e protease respectivamente de *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25, compreendendo as etapas de

- (i) plaquear *Chrysosporium lucknowense* em placas de celulose inchada com ácido (ASC),
- (ii) selecionar pelo menos uma colônia mostrando uma zona clareada de celulose reduzida,
- (iii) plaquear a cepa selecionada na etapa (ii) em placas de leite desnatado, e
- (iv) selecionar pelo menos uma colônia mostrando um halo reduzido de degradação de proteína. Preferencialmente este método compreende ainda as etapas de mutagênese antes das etapas (i) e/ou (iii).

Se neste pedido de patente os hospedeiros são definidos por comparação do nível de produção de várias enzimas com *Chrysosporium lucknowense* cepa 18-25 então, claro, a produção de uma e da mesma enzima no hospedeiro deve ser comparada com aquela de *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25.

As proteínas mencionadas neste pedido de patente como, por exemplo, protease,  $\beta$ -glucanase, celobiohidrolase, proteinase A,  $\beta$ -glucanase, exo-quitinase e laminarinase fo-

ram definidas conforme descrito no WO 2009/0918537, em nome de Dyadic International Inc.

Para enfatizar as vantagens fornecidas pela presente invenção: esta refere-se ao isolamento de novos fungos hospedeiros que perderam suas capacidades intrínsecas de secretar altos níveis de variedade de proteínas de fundo, enquanto retêm a capacidade de secretar altos níveis de somente algumas enzimas ativas. A invenção também diz respeito à utilização destes hospedeiros para produzir enzimas específicas em altos níveis sem a co-produção de altos níveis de proteínas não-específicas. Além disso, a invenção refere-se à geração de misturas definidas de enzima adaptadas para diferentes aplicações.

10 A invenção agora será elucidada pelos seguintes exemplos não limitantes.

Legendas das figuras mencionadas:

Figura 1: amostras de meio de UV 18-25, W1L tipo selvagem, W1D tipo selvagem e as proteases mutantes W1L# 100.1, W1D#50.g e W1D# 100.b em SDS-PAGE. Essas cepas foram cultivadas em meio #1 (meio de baixa densidade com celulose) por 282 horas, exceto para raia 8, que é uma amostra em meio #2 (de alta densidade). A amostra média na raia 1 foi 2 vezes a diluída e o meio de amostra na raia 8 foi 4 vezes diluída.

Figura 2: Amostras de meio de cultura em frasco de agitação de CI cepa W1L#100.1 e derivados. Raia 1, W1LJ100.1; raia 2, W1L#100.1 $\Delta$ chil; raia 3, W1#100.1 $\Delta$ alpl; raia 4, W1L#100.1 $\Delta$ alpl $\Delta$ chil.

20 Figura 3: Vetor de clonagem de cosmídeos pAopyrGcosarp1.

Figura 4: plasmídeo pCHI4.8. O plasmídeo, que foi isolado do clone #5 de *E. coli* é mostrado. Este plasmídeo foi usado na construção de vetores de expressão gênica de cepa branca.

Figura 5: A super-expressão de chil através da introdução de cópias extras do gene chil em W1L#100.1, Raia 1, W1L#100.1 cepa selvagem (controle); raia 3, W1L#100.1 [chi+/pyr5]#3; raia 4, W1L#100.1 [chi+/pyr5]#9; raia 5, W1L#100.1 [chi+/pyr5]#17.

Figura 6: Plasmídeo Pcbhl-glaA (II)-Tcbhl. Este plasmídeo foi usado na construção de vetores de expressão gênica de cepa branca.

Figura 7: O vetor de expressão do gene pPchil (1,8)-Tcbhl NOTL.

30 Figura 8: Um mapa esquemático do vetor de expressão do gene pCRS-pPchil(1.8)-Tcbhl.

Figura 9: Análise de SDS-PAGE de amostras de cultura sobrenadante de W1L#100.L  $\Delta$ alpl  $\Delta$ pyr5 (B2), e cepas transformadas expressando CL10518 de W1L#100.L  $\Delta$ alpl $\Delta$ pyr5 (B3, B4). A seta indica a posição CL10518.

35 Figura 10: Análise de SDS-PAGE de amostras de sobrenadante de cultura de W1L#100.L $\Delta$ alpl $\Delta$ pyr5 (D1), e de cepas transformantes que expressam cbh2 de WI LJ 100. L  $\Delta$ alpl $\Delta$ pyr5 (D3-D5). A seta indica a posição CBH2.

Figura 11: Análise de SDS-PAGE de amostras de sobrenadante de cultura de W1L# 100.L  $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ pyr5 transformado com pyr5 somente (C), e de cepas transformadas que expressão pgx de W1L#100.L  $\Delta$ alp1  $\Delta$ chi1 $\Delta$ pyr5 (1, 2).

Figura 12: Análise de SDS-PAGE de amostras de sobrenadante de cultura de W1L#100.L $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ pyr5 transformada com xyl1 (31, 34) e com um xyl1 $\Delta$ cbd. As setas indicam as bandas de proteínas representando as variantes xilanase respectivas.

Figura 13: análise de SDS-PAGE de amostras de sobrenadante de cultura de W1L#100.L  $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ pyr5 transformada com meio com marcador de seleção somente (71) e com abn2 (68-70), M, marcador.

Figura 14: Análise dos transformantes chil. #1, cepa de controle (transformada com marcador de seleção pyr5 somente), M, marcador. # 65, transformantes chil. A seta indica a banda de proteína Chil.

Figura 15: gel de proteína de *Aspergillus niger* PGII heteróloga purificada produzida por C1. M, proteínas marcadoras. Os pesos moleculares de três proteínas marcadoras são indicados à esquerda do gel. Raia 1, PGII purificada.

#### Exemplos

Exemplo 1: Isolamento de mutantes C1 com atividade de celulase bastante reduzida (cepas brancas).

Cepa C1 UV 18-25 (descrita em WO/2000/020555) foi mutada usando luz UV para produzir a cepa UV26-2 (Apêndice 1 dos Exemplos). UV26-2 exibiu grandes zonas de clareamento em placas ASC (celulose inchada com ácido), indicando excesso de produção de celulase.

UV26-2 não era um mutante estável e estrias sucessivas de UV26-2 resultaram na geração de mutantes celulase negativa como mostrado pela ausência de zonas clareadas nas placas ASC. Estas colônias apresentaram esporulação aumentada e cor branca, enquanto as colônias normais, produtoras de celulase, foram de cor creme e não apresentaram esporulação nas placas ASC.

Duas colônias brancas (UV26-2W1 e UV26-2W2) foram escolhidas a partir das placas ASC, junto com duas colônias normais e a produção de celulase foi avaliada usando um procedimento de triagem em frasco de agitação. As colônias brancas produziram 6 e 4 U/ml de atividade de celulase AzoCMC, enquanto as duas colônias normais produziram 278 e 294 U/ml de atividade de celulase. Isso confirmou as colônias brancas como sendo mutantes celulase-negativas.

Exemplo 2: Isolamento e análise de cepas de protease deficientes de UV26-2W1L e UV26-2W1D.

A purificação da cepa UV26-2W1 em placas de meio RM-ASP (Apêndice 2 dos Exemplos) resultou na identificação de dois tipos de colônias: colônias com esporos coloridos



W1L#100.1 $\Delta$ alp1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	46
W1D parente	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	nd
W1D#50.g	-	-	-	++	++	++	++	nd
W1D#100.b	++	++	++	++	++	++	++	nd
UV 18-25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	nd

Tabela 1: Análise de meio de cepas parentes W1L e W1D e suas proteases mutantes selecionadas: W1L#100.1, W1D#50.g e W1D#100.b. UV 18-25 foi tomado como controle. Atividades de protease de amostras de meio de W1L, W1L#100.1 e W1L#100.1 $\Delta$ alp1 foram ainda determinados. Estas cepas foram cultivadas no meio #1 (baixa celulose/lactose/pharmamedia). O pH foi medido e o meio foi colocado em placas para determinar sua atividade de protease. O tamanho relativo do halo é uma medida para a atividade de protease no meio; nd = não determinado.

Análise de amostras de meio de 282 horas destas cepas em gel de SDS-PAGE mostrou que as 'cepas brancas' produziram muito menos proteína do que UV 18-25 (Fig. 1). Em particular, as duas principais proteínas 50/70 kDa (Cbhl) estavam ausentes nestes sobrenadantes de cultura. Nas cepas brancas as proteínas 'principais' são as de 75 e 45 kDa. Estas proteínas estão presentes no meio de UV 18-25 como proteínas secundárias.

A partir desta primeira triagem para mutantes sem protease em um UV26-2W1 de fundo as cepas W1D#50.g e W1L#100.1 foram selecionados para análise posterior.

Exemplo 3: Comparação das atividades enzimáticas extracelulares entre UV 18-25 e W1L#100.1.

As atividades enzimáticas diferentes no conteúdo de proteína extracelular das amostras de UV 18-25 e W1L#100.1 foram determinadas (Tabela 2). Com base nestes dados foi concluído que W1L#100.1 secreta muito pouco de atividade de celulase específica (menos de 1 % de UV 18-25) e tem muito pouca ou nenhuma atividade de protease detectável quando comparado a UV 18-25.

Atividades	UV18-25	W1L#100.1
CMCase (celulase)	6,20	0,04
Beta-glucanase	10,2	0,53
Celibiohidrolase	0,72	0,09
Protease (pH 5)	0,06	0,03
Protease (pH 7)	0,05	0,00
Protease (pH 9)	0,04	0,00

Tabela 2: Atividades específicas das amostras (U/mg de proteína). As atividades de

protease foram medidas em três diferentes valores de pH. Além disso, os níveis de hidrolases portando outras especificidades de substrato (por exemplo, hemi-celulose) foram reduzidos também.

Exemplo 4: Outra redução do nível de proteína: identificação de proteínas principais.

Como descrito acima, a cepa branca é desprovida do espectro de enzimas celulolíticas extracelular quando comparado à sua cepa parental. Assim, o conteúdo de proteína extracelular em culturas de cepa branca, como analisado por SDS-PAGE, é baixo. Esta característica da cepa é benéfica em relação à produção de proteínas e purificação, já que a quantidade relativa de qualquer proteína-alvo, expresso em cada cepa será alta. Além disso, a ausência (quase) de atividade celulase torna a cepa branca uma cepa hospedeira ideal para testes de celulasas novas ou modificadas. O mesmo é válido para xilanases como nenhuma atividade xilanase principal foi detectável.

Para reduzir ainda mais o nível de fundo de proteínas, várias bandas de proteínas principais presentes em um gel SDS-PAGE de um W1L#100.1 e culturas de cepas derivadas foram excisadas e identificadas por sequenciamento N-terminal e/ou análise de MS-MS. A proteína mais abundante foi a Chil endoquitinase (identificador de gene: CL06081, peptídeos MVYDYAG, MPIYGRS e MFXEASA). Outras proteínas principais foram identificadas como glicoamilase (GlaI, CL09507, peptídeos TGGWSVV WPVLK (SEQ ID No 1) e VVGSSSEL(I)GNWDTGR (SEQ ID NO 2)), exo-quitinase (Chi2, CL00367, peptídeos TIDAMAWSK (SEQ ID No 3), NFLPV ADILR (SEQ ID No 4), GAYHPSQTYSPEDEK (SEQ ID NO 5), e SWQLVYQHDPTAGLTAEAK (SEQ ID No 6) e uma laminarinase (LamI, CL08253, peptídeos PQYESAGSVVPSSFLSVR (SEQ ID No 7) e VSGQVELTDFLVSTQGR (SEQ ID No 8). Ainda uma protease alcalina Apl (CL04253) foi identificada em caldo de cultura de W1L#100.1. Apl degrada proteínas extracelulares, e pode degradar as proteínas de interesse.

Exemplo 5: Outra redução do nível de proteína: Interrupção dos genes *chi1*, *chi2*, *sla1* e *lam1*.

O vetor pChi3-4 (vide Exemplo 9, Isolamento do gene que codifica endoquitinase 1) foi utilizado para a construção do vetor de interrupção de gene. Um fragmento de 1,1-kb *MscI/StuI* foi substituído com o marcador de seleção *amdS*-rep ou o marcador de seleção *pyr5*-rep, resultando na vetores  $p\Delta chi1-amdS$  e  $p\Delta chil-pyr5$ , respectivamente. O fragmento de interrupção  $\Delta chi1-amdS$  foi isolado de  $pAchi1-amdS$  por digestão com *EcoRI*. O fragmento de interrupção  $\Delta chi1-pyr5$  foi isolado de  $p\Delta chil-pyr5$  por digestão com *SmaI*. A transformação da cepa W1L#100.1  $\Delta pyr5\#172-12$  usando os fragmentos de interrupção resultou em 215 transformantes  $\Delta chi1-pyr5$  e 32 transformantes  $\Delta chi1-amdS$ . Todos os transformantes obtidos foram purificados e analisados com hibridização de colônia. Análise de Southern

destes transformantes confirmou o isolamento de um transformante W1L#100.1 com um gene *chi* interrompido (W1L#100.1  $\Delta$ *pyr5* $\Delta$ *chi1-pyr5*#46 (*pyr5*+)).

Culturas em frasco de agitação em meio C1 de baixa densidade foram realizadas a partir de uma seleção de cepas mutantes W1L#100.1 $\Delta$ *pyr5* $\Delta$ *chi1*. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE para avaliar os perfis de proteínas para a ausência de uma proteína Chi1 (Fig. 2, raia 2 versus raia 1). Como mostrado nenhuma proteína de 45 kDa Chi1 é observada na cepa mutante  $\Delta$ *chi1*.

Os restantes mais importantes de proteínas extracelulares em cepa branca W1L#100.1 $\Delta$ *alp1* $\Delta$ *chi1* e cepas derivadas correspondem a glicoamilase (Gla1), exo-quitinase (Chi2) e laminarinase (Lam1). Estas enzimas foram purificadas a partir do meio de cultura. As atividades enzimáticas destas proteínas foram verificadas usando (entre outros) amido, quitosana e laminarina, respectivamente, como substratos. Além disso, dados de análises de espectrometria de massa (vide Exemplo 4) combinados com dados de sequência do genoma de Cl revelaram os genes correspondentes. A fim de reduzir ainda mais a proteína extracelular de fundo, genes que codificam Gla1, Chi2, e Lam1 foram interrompidas e, assim, inativados. A interrupção foi baseada na troca do promotor do gene e parte da sequência de codificação 5' por um marcador de seleção *amdS* via recombinação homóloga usando aproximadamente sequências de 1,5 kbp upstream e downstream que flanqueiam estes genes promotores e parte da sequência de codificação 5'. Os vetores de interrupção gene, portanto, continham o cassete de expressão *amdS* mais estas sequências de genes homólogos de flanqueamento de 1,5 kb. Cepas brancas W1L#100.1  $\Delta$ *alp1* $\Delta$ *chi1* e cepas derivadas foram transformadas com os vetores de interrupção de *gla1* e *chi2* e *lam1* as transformantes foram triadas para o genótipo correto usando PCR. Como tal, as cepas brancas com um conteúdo/composição de proteína extracelular ainda mais reduzido foram obtidas. Proteínas-alvo produzidas por essas cepas foram mais de 80% puras no líquido de cultura bruto livre de células.

Exemplo 6: Outra redução da atividade de protease: interrupção específica de genes que codificam proteases.

Em geral, os genes que codificam protease foram interrompidos utilizando fragmentos de DNA que continham marcadores de seleção (*amdS*, *pyr4* ou *pyr 5*) flanqueados por aproximadamente 1,5 kb de fragmentos de DNA grandes homólogos às regiões up e downstream do gene a ser interrompido. Após a introdução destes fragmentos de DNA de interrupção no hospedeiro branco, uma recombinação homóloga trocou o gene a ser interrompido para o fragmento marcador de seleção. Transformantes correspondentes foram selecionados como tal. Genes que foram interrompidos desta forma codificaram de forma desvantajosa (em relação a estabilidade da proteína alvo) atividades de protease, por exemplo, *alp1*, *alp2*, *pep4*) ou proteína de fundo significativa (*chi1*) ou deviam ser usados como mar-

gador de seleção (*pyr4*, *pyr5*). Através desta abordagem numerosos cepas brancas CI foram construídos que podem ser utilizadas como hospedeiros para a expressão da proteína-alvo (Tabela 3).

W1L
W1L SUI <sup>R</sup> #S2 6.14
W1L SUI <sup>R</sup> #S2 6S
W1L#100.1
W1L#100.1 $\Delta$ pyr5
W1L#100.1 $\Delta$ alp1
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ pyr5
W1L#100.1 $\Delta$ pep4 $\Delta$ pyr5
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ pep4
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ pep4 $\Delta$ pyr5
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ alp2 $\Delta$ pyr5
W1L#100.1 $\Delta$ chi1
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ pyr5
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ alp2
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ alp2 $\Delta$ pyr5
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ pep4
W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ chi1 $\Delta$ gla1 $\Delta$ lam1 $\Delta$ chi2 $\Delta$ pyr5

5 Tabela 3: Cepa W1L e derivados

Exemplo 7: Identificação dos promotores fortes para a expressão do gene: gene que codifica quitinase (*chi1*).

Várias bandas de proteínas principais foram isoladas de amostras de fermentação de W1L#100.1 cultivadas em meio de celulose de baixa densidade, a fim de identificar e  
10 isolar os promotores fortes que podem ser usados para a expressão do gene na cepa W1L e seus derivados. O sequenciamento N-terminal de uma mistura de peptídeos obtida após

tratamento de CNBr da proteína principal de 45 kDa de WI L#100.1 resultou na identificação de quatro peptídeos diferentes. Três destes peptídeos (MVYAG, MPIYGRS e MFXEASA) apresentaram homologia com uma endoquitinase de *Aphanocladium album/Trichoderma harzianum* (CHI\_APHAL P32470).

5 Com base em três dessas sequências de peptídeos, os primers foram desenhados a fim de obter fragmentos de PCR contendo uma parte do gene que codifica endoquitinase (Tabela 4). Os primers de PCR foram desenhados com base no uso codon preferencial de C1.

Primer	Região	Posição	Sequência deduzida
Endochitpep1C	MVYDYAG (SEQ ID No. 9)	240aa	ATGGTSTACGACTACGCB GC (SEQ ID No 10)
Endochitpep2C Endochitpep2revC	MPIYGRS (SEQ ID No 11)	290aa	ATGCCSATCTACGGYCG (SEQ ID No. 12) CGRCCGTAGATSGGCAT (SEQ ID No 13)
Endochitpep3revC	MFXEASA (SEQ ID No. 14)	380aa	GCSSWVGCCTCCAGAAC AT (SEQ ID No 15)
Primer baseado em uma região homóloga conservada de endoquitinase			
Endochit3c	DGIDIDWEV (SEQ ID No 16)	160aa	GAYGGYATCGAYRTSGAY TGG (SEQ ID No 17)

Tabela 4: Primers desenhados de endoquitinase putativa com base no uso de có-

10 don Cl.

As reações de PCR com esses primers foram realizados utilizando DNA cromossômico de UV 18-25 DNA como modelo. Fragmentos de PCR foram clonados e análise da sequência mostrou que um dos fragmentos de PCR clonados obtidos com Endochitpep1c e Endochitpep2revc (173 pb) continha uma parte de um gene codificando endoquitinase (15 *chi1*). Análise de hibridização de DNA cromossômico de UV 18-25 digerida *Bam*HI e *Hind*III com este fragmento de *chi1* como sonda mostrou um sinal claro de hibridização, confirmando que o fragmento de PCR originou DNA de C1. Este fragmento foi usado para clonar o gene completo da biblioteca de gene de cosmídeos Cl ordenados. A sequência de fragmento (SEQ ID No 18) foi como a seguir:

20

ATGGGCTACGACTACGCCGGCTCGTGGAGCACCGCGGGGACACCAGGCC  
AACCTGTACCCGACCGCCGACGCGGGCAGGACGCCCTTCTCGACCGACAAGGCCCTG  
TCCGACTACGTGCGCCGCGGCGTCCGACCCGGCCAAGATCGTGCTCGGCATGCCCATCT  
ACGGCCG

Exemplo 8: Construção de uma biblioteca de cosmídeo ordenada de *Chrysospori-*

um lucknowense UV 18-25 em *E. coli*.

Para a construção da biblioteca de cosmídeo de Cl o vetor de clonagem de cosmídeo não comercial, pAOpyrGcosarpl (Fig. 3) foi utilizado. Este vetor carrega o marcador de seleção de *Aspergillus oryzae* pyrG que permite a transformação de uma ampla gama de cepas fúngicas. Além disso, para a transformação altamente eficiente de várias espécies de *Aspergillus* (para o qual uma grande coleção de cepas mutantes está disponível para clonagem de complementação do gene Cl correspondente) o replicador AMA1 está presente neste vetor. Um sítio de clonagem exclusivo de *Bam*HI permite a clonagem de DNA genômico de *Sau*3A parcialmente digerido de *Chrysosporium* cepa UV 18-25.

Uma biblioteca de cosmídeo de UV 18-25 foi construída em *E. coli* e armazenada como estoques de glicerol em -80°C. O tamanho médio de inserção foi de 20-35 kb. No total, 6800 clones foram obtidos, o que representa uma cobertura do genoma de cerca de 5 vezes. Para ordenar estes clones em placas de 384 poços, diluições dos estoques em glicerol foram semeadas em placas LB-ágar, contendo ampicilina. 7680 colônias individuais foram colhidas manualmente e inoculadas em vinte placas de 384 poços. Estas vinte placas de 384 poços representam a biblioteca ordenada de cosmídeo de UV 18-25 em *E. coli*.

As colônias individuais nas vinte placas de 384 poços foram marcadas em filtros de náilon (Hybond), usando um Staccato 384-pintool (Zymarks). A biblioteca de cosmídeos ordenada foi marcada em octuplicada (num total de 160 filtros). Estes filtros foram colocados em placas de meio LB-ampicilina e incubados a 37°C para permitir que as colônias crescessem nos filtros. Posteriormente, as colônias foram lisadas e o DNA cosmídeo foi ligado aos filtros usando procedimentos padrões.

Exemplo 9: Isolamento do gene que codifica endoquitinase 1 (*chi1*).

O fragmento de PCR de 173-bp de *chi1* foi usado como uma sonda radioativa marcada para a hibridização de filtros duplicados da biblioteca de cosmídeo. A hibridização da biblioteca de gene cosmídeo usando este fragmento *chi1* resultou em três clones positivos. O DNA foi isolado a partir desses clones e análise de restrição seguida de análise de Southern foi conduzida. Um fragmento de 4,8 kb *Hind*III e um fragmento de 3,4 kb *Bgl*II mostraram hibridização utilizando a sonda *chi1*. Os fragmentos 4,8 kb *Hind*III e 3,4 kb *Bgl*II contendo o gene *chi1* foram isoladas e subclonados em pMTL24, resultando nos vetores pCHI4.8 (Fig. 4) e pChi3-4, respectivamente. Posteriormente, um sub-clone *Bgl*II foi utilizado para análise de sequência para obter mais dados de sequência. A sequência completa do gene *chi1* de 18-25 UV foi obtida. O tamanho do gene *chi1* é 1529bp no qual dois introns de 111 bp e 138bp estão presentes.

Exemplo 10: A superexpressão do endoquitinase em W1L#100.1.

Para a superexpressão de endoquitinase o fragmento *Bgl*II 3,4kb contendo o gene *chi1* foi isolado de pChi3-4. Cepas multi-cópias de *chi1* putativos em W1L#100.1Δpyr5 foram

geradas por co-transformação do fragmento 3,4 kb *Bgl*II de *chi1* e do fragmento de seleção *apyr5* e as transformantes corretas foram confirmadas por hibridação de colônia. Culturas em frasco de agitação em meio C1 de baixa densidade foram realizadas a partir de uma seleção de cepas multi-cópias de W1L#100.1. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE para avaliar os perfis de proteínas para a superexpressão de *Chi1* (Fig. 5). Três das cepas multi-cópias de *chi1* (raias 3, 4, 5) mostraram uma banda de 45 kDa mais forte comparada à cepa parente (raia 1) indicando superexpressão de quitinase e a utilidade do promotor de *chi1* para alta expressão gênica.

Portanto, um vetor geral de clonagem expressando C1 (pPchi1 (0,8)-Tcbh1 NOTL) foi construído contendo o promotor *chi* (*Pchi*) para dirigir a superexpressão de genes clonados. Inicialmente, o sítio *Eco*R1 upstream op *Pchi1* em PCHI#4.8 foi removido por um digestão parcial de *Eco*RI e tratamento do fragmento linear com Klenow gerando #4.8Δ pCHI1*Eco*R1. A partir deste vetor o fragmento 1,9-kb *Sac*I-*Sph*I foi clonado sítio correspondente de pPc-*bh1-glaA* (II)-*Tcbh1* (Fig. 6). No vetor resultante, pPchi-*Tcbh1 NotI*#7.1, os genes-alvo podem ser inseridos nos sítios *Nco*I-*Eco*RI. Cassetes de expressão para transformação em cepas C1 podem ser isolados a partir destes construtos como fragmentos *NotI*.

A sequência promotora de 0,8 kb *chi1* em pCHI#4.8 poderia ser mais do que suficiente para conduzir a expressão de *chi1*. No entanto, um promotor *chi1* mais longo também foi gerado, amplificando o fragmento de um *Pst*I-*Hind*III (upstream do sítio *Hind*III na posição -775 em relação ao códon iniciador ATG), usando um clones cosmídeos positivos previamente identificados como modelo de DNA. O fragmento resultante foi clonado em pGEM-T-Easy e sequenciados. A partir deste plasmídeo o fragmento *Pst*I-*Hind*III foi isolado e clonado nos sítios correspondentes de pPchi1-*xyl1-Tcbh1* gerando pPchi1(1,8)-*xyl1-Tcbh1*, no qual o tamanho promotor é de 1,8 kb. O fragmento foi também clonado no sítio correspondente de pPchi1-*Tcbh1 NotI*#7.1, gerando a expressão geral do vetor pPchi1(1,8)-*Tcbh1 NotI* (Fig. 7).

Os níveis de expressão de gene direcionados pelo promotor de quitinase estendido (*Pchi1* (1.8)) e pelo promotor quitinase inicialmente usado (*Pchi1* (0.8)) foram comparados pela expressão de dois genes repórteres, *xyl1* e *alp1*. Transformantes de cepa branca foram geradas que expressaram *xyl1* (que codifica uma xilanase) ou *alp1* (que codifica uma protease alcalina) (Tabela 5).

Repórter	0,8 kb Pchi1 Atividade repórter	1,8 kb Pchi1 Atividade repórter
Alp 1(R19)	0,7 (A)	1,9 (B)
Xyl1 (R14)	122 (C)	1175 (D)

Tabela 5: Comparação dos promotores *Pchi1* curto e estendido em termos do nível de expressão da proteína repórter. Atividade repórter, atividade de xilanase é expressa co-

mo U/ ml e atividade de protease alcalina como U/ mg de proteína. A = W1L#100.1[Pchi1(0,8)-apl/pyr5]#9, B = W1L#100.1[Pchi1(1,8)-apl/pyr5]#22, C = W1L#100.1 $\Delta$ apl[Pchi1-xyl]#95, D = W1L#100.1 $\Delta$ apl 1[Pchi1(1,8)-xyl]#A7.

Surpreendentemente, a expressão do gene repórter foi maior no caso do promotor *chi1* estendido (1,8 kb), que indica a necessidade de regiões mais upstream. Em conclusão, um sistema de expressão baseado em *Pchi1* foi desenvolvido para alto nível de expressão de genes in cepas Brancas C1.

Exemplo 11: Identificação de outros promotores fortes para a expressão de gene.

Uma abordagem diferente para pesquisar promotores fortes foi realizada com a detecção quantitativa dos níveis de RNA mensageiro de W1L ou W1L100.1RNA. As amostras de RNA foram isoladas de micélio, que foram amostradas em momentos diferentes durante um processo de fermentação em batelada alimentada. Um número de genes foi identificado como sendo fortemente expresso. Para verificar o nível de expressão desses genes, as amostras de RNA também foram separadas em gel, borradas e hibridizadas para sondas específicas para estes genes (Tabela 6).

Cepa/alimentação	chi1	pep4	his2a	hex1	bgl1	xyl6	cbh1
<u>W1L/glicose</u>							
Lote	0	4	2	21	0	0,3	0
Dia 1 de aliment.	47	5	3	15	8	1	0
Dia 2 de aliment.	52	3	3	17	8	1	0
<u>W1L#100.1/xilose</u>							
Lote	0	0,2	0	12	0	0	0
Dia 1 de aliment.	40	3	2	12	3	19	0
Dia 2 de aliment.	36	4	6	17	5	21	0
<u>W1L#100.1/glicose</u>							
Lote	0	0,1	3	23	0	0,1	0
Dia 1 de aliment.	61	0,5	2	17	7	0,2	0
Dia 2 de aliment.	59	0,2	2	14	6	1	0

Tabela 6: Quantificação dos sinais de expressão de diferentes genes em fermentações de batelada controladas. Sinais de hibridização da sonda foram quantificados utilizando um densitômetro. O sinal da sonda no Northern blot foi correlacionado com o sinal da sonda de DNA genômico de *Cl* em um Southern blot. Portanto, os valores na tabela representam o nível do sinal de hibridização do Northern em relação ao nível do sinal de hibridização do Southern blot (que foi fixado em 1). As sequências de gene são dadas abaixo.

O promotor *cbh1*, que é um promotor forte em cepas UV 18.25, não é ativo nas cepas brancas. O promotor *chi1* foi o mais forte tanto sob condições de alimentação de glicose quanto xilose. O promotor *hex1* é um forte promotor constitutivo durante todas as fases de

fermentação e em ambas as condições de alimentação de açúcar. O promotor *xy16* é altamente ativo sob a condição de alimentação apenas de xilose. Os promotores *pep4*, *his2a* e *bgl1* são moderadamente ativos. Para a expressão de genes de alto nível nas cepas brancas os promotores *chi1*, *hex1* e *xy16* são muito úteis. Promotores alternativos que também geram alta expressão são os dos genes *pep4*, *his2a* e *bgl1*. Experiências adicionais de Northern também indicaram que os promotores dos genes *xy14* e *xy18* podem ser usados para a expressão de genes de alto nível nas cepas brancas quando cultivadas em xilose. Glicoamilase (*Gla1*, identificador de gene: CL09507) demonstrou ser uma proteína principal em cepas C1 brancas. O promotor *glal* é, portanto, também um bom candidato a ser utilizado para a expressão de alto nível de genes de interesse em cepas brancas. Foi demonstrado que glicoamilase foi altamente abundante em uma cepa branca que cresceu na presença de amido. Isto indicou que o promotor *glal* é forte e induzível por amido e seus produtos de degradação, como a maltose.

As seqüências de nucleotídeos de Pch1 1 (0,8), Pch1 1 (1,8), Phex1, Pxy16 e PGIA 1 são apresentados abaixo. Notar que os códons de iniciação ATG das regiões de codificação correspondentes são apresentados em negrito e itálico.

#### Exemplo 12: Sistema de expressão de gene de cepa branca

Dois vetores de expressão foram projetados para expressão de genes no W1L e derivados: pPchil (1,8)-Tcbhl Not1 foi como descrito acima. Além disso, PCRs Pchil-Tcbhl (Fig. 8) foi construído, colocando a seqüência repetida C1 na frente do promotor Pchil em pPchil (1,8)-Tcbhl Not1. Estes vetores foram projetados de tal forma que eles também podem ser combinados, resultando em um único vetor que contém vários cassetes de expressão. Os cassetes múltiplos podem ser excisados do vetor como um único fragmento de DNA linear.

Muitos genes foram clonados e expressos em W1L ou derivados. O procedimento geral foi o seguinte:

- Genes foram identificados pela purificação e caracterização dos produtos gene (genética reversa) e/ou pela mineração genoma. Os genes foram amplificados por PCR ou sintetizados quimicamente. A amplificação de genes por PCR foi realizada usando polimerases de DNA PCR *proof-reading* (Phusion ou Supertaq plus). Os genes amplificados foram clonados em vetores de clonagem PCR, ou seja, pGEM-T-Easy (Promega) ou pJet1 (Fermentas) e sequenciados para verificar a regularidade da seqüência. Posteriormente, os genes foram liberados do vetor de clonagem PCR e ligados nos sítios *Nco1* e *EcoRI* do(s) vetor(es) de expressão.

- Cuidado especial foi tomado na concepção dos primers PCR. O códon ATG de início do gene a ser expresso era parte do sítio de restrição *Nco1* nos vetores de expressão da cepa branca. Portanto, os primers PCR 5'(ATG) continham sítios de restrição, que são

compatíveis ao site restrito *NcoI* do vetor. Estes sítios foram, ou seja, próprio *NcoI* (C↓CATGG), ou sítios compatíveis que foram cortados dentro do sítio de reconhecimento (*BspHI*, T↓CATGA; *PciI*, A↓CATGT), ou sítios compatíveis que são cortados fora do sítio de reconhecimento (*BsaI*, GGTCTC(1/5); *BspMI*, ACCTGC(4/8); *Esp31*, CGTCTC(1/5)).

5 - Em alguns casos, sítios adicionais de restrição para aqueles que seriam usados para clonagem de genes foram encontrados nos genes. Nestes casos, os genes foram amplificados por fusão em PCR, onde a fusão de dois fragmentos de PCR foi selecionada para ocorrer no sítio de restrição adicional não desejado. O sítio de restrição indesejado foi removido usando primers de fusão contendo mutações de substituição na sequência do sítio de  
10 restrição indesejado. Caso o sítio de restrição indesejado estivesse presente dentro de uma região de codificação de proteína, o nucleotídeo substituído foi selecionado de tal maneira que o códon mutante que codificasse o mesmo aminoácido que o códon original.

- Os cassetes de expressão foram liberados a partir da estrutura do vetor DNA de *E. coli* DNA pela restrição *NofI*. O cassete de expressão foi posteriormente transformado em  
15 derivados W1L simultaneamente com um marcador de seleção, ou seja, *pyr5* ou *amdS* em experimentos de co-transformação.

- Transformantes que produzem positivos e elevados foram selecionados por SDS-PAGE ou análise de ensaio de enzimas do meio de crescimento. Melhores produtores foram aplicados em fermentações para a produção de grande quantidade do produto do gene de-  
20 sejado.

- As seguintes proteínas foram produzidas usando o sistema de expressão de gene da cepa branca e os genes correspondentes.

No pedido de patente internacional WO 2009/018537 foi descrito:

Abf1, Abf2, Abn1, Axel, Bgl1 (=Bgl3A), Cbh1, Cbh2, Cbh4, Chil, Eg2, Eg5, FaeA1, Fa-  
25 eA2, FaeB2, Gall (=Gal53A), Glal (=Gla15A), Pmel, Xyl1, Xyl1(cd), Xyl2, Xyl3, Xyl3-cbd (=xyl3(cd)), Xyl4, Xyl5, Xyl6.

No pedido de patente internacional WO 2009/033071 foi descrito:

Genes AbO, Abn2, Abn3, Abn4, Abn5, Abn7, Abn9, Agul, Axe2, Axe3, Bga2, Bxl1, Bxl2, Abf5(antigamente conhecido como Bxl3), GH61 (identificadores de gene: CL09768,  
30 CL10518, CL05022, CL04725, CL04750, CL06230, CL05366), Gln, Pgx 1, Rgal, Rgxl, Xgl1, Xyl7, Xyl8, Xyl9, Xyl10, Xyl11.

Alpl: A sequência de DNA Alpl é dada por SEQ ID NO 30. A sequência de aminoácido Alpl é dada em SEQ ID NO 31.

O gene *alpl* foi expresso e Alpl apresentou atividade de protease (Tabela 5). O "kit de detecção colorimétrica de protease" (Sigma, número do produto PC0100) foi usado para  
35 determinar a atividade de protease de Alpl.

Exemplo 13: Expressão de genes que codificam as famílias de proteína GH61 Cl.

Um gene que codifica a proteína GH61 (identificador CL 10518) foi super expresso em cepas CI W1L#100.L  $\Delta$ alpl $\Delta$ pyr5 e W1L#100.1 $\Delta$ alpl $\Delta$ chil $\Delta$ pyr5. Amostras de sobrenadante de cultura foram analisadas por SDS-PAGE e bandas de proteínas foram coradas com Coomassie azul brilhante (CBB). A proteína CL10518 é  $\pm$  26 kDa (Fig. 9). Um padrão de fermentação em batelada alimentada foi realizado, que rendeu 13 g de proteína por litro de filtrado de fermentação, com base em um ensaio de determinação de proteínas BCA.

A análise funcional desta proteína foi descrita no pedido de patente internacional WO 2009/033071.

Exemplo 14: Expressão de um gene que codifica células de Cl. cbh2.

O gene que codifica CBH2 (identificador CL09854) foi super expresso em CI cepa W1L#100.L  $\Delta$ alpl $\Delta$ pyr5. As amostras de sobrenadante de cultura foram analisadas por SDS-PAGE e as bandas de proteína foram coradas com coomassie azul brilhante (CBB). A proteína CBH2 migra em cerca de 55 kDa (Fig. 10). Um padrão de fermentação em batelada alimentada foi realizado, que rendeu 10 g de proteína por litro de filtrado de fermentação, com base em um ensaio de determinação de proteínas BCA.

A análise funcional desta proteína foi descrita no pedido de patente internacional WO 2009/018537.

Exemplo 15: Expressão de gene pgx que codifica exo-poligalacturonase de Cl.

O gene que codifica PGX (identificador CL 10389) foi super expresso em CI cepa W1L#100.L  $\Delta$ alpl $\Delta$ chil $\Delta$ pyr5. As amostras de sobrenadante de cultura foram analisadas por SDS-PAGE e as bandas de proteína foram coradas com coomassie azul brilhante (CBB). A proteína PGX migra em cerca de 60 kDa (Fig. 11). Um padrão de fermentação em batelada alimentada foi realizado, que rendeu 9 g de proteína por litro de filtrado de fermentação, com base em um ensaio de determinação de proteínas BCA.

O ensaio a seguir foi usado para medir a atividade da poligalacturonase. Este ensaio mede a quantidade de açúcares redutores liberados do ácido poligalacturônico (PGA) pela ação de uma poligalacturonase. Uma unidade de atividade foi definida como 1  $\mu$ mole de açúcares redutores liberados por minuto nas condições de reação especificadas.

Reagentes

- Tampão acetato de sódio (0,2 M, pH 5,0) é preparado como a seguir. 16,4 g de acetato de sódio anidro ou 27,2 g de acetato de sódio  $\cdot$  3H<sub>2</sub>O é dissolvido em água destilada de modo que o volume final da solução seja 1000 mL (Solução A). Em um frasco separado, 12,0 g (11,44 mL) de ácido acético glacial é misturado com água destilada para gerar o volume total de 1000 mL (Solução B). O tampão final 0,2 M de acetato de sódio, pH 5,0, é preparado pela mistura da solução A com B solução até que o pH da solução resultante seja igual a 5,0.

- Ácido poligalacturônico (PGA) foi adquirido da Sigma (St. Louis, EUA).

- Reagente A: 10 g de ácido p-hidroxibenzoico hidrazida (PAHBAH) suspenso em 60 mL de água. 10 mL de ácido clorídrico concentrado foram adicionados e o volume é ajustado para 200 ml. Reagente B: 24,9 g de citrato trissódico foram dissolvidas em 500 ml de água. 2,2 g de cloreto de cálcio foram adicionadas, bem como 40 g de hidróxido de sódio. O volume foi ajustado para 2 L com água. Ambos os reagentes foram armazenados em temperatura ambiente. Reagente de Trabalho: 10 ml de reagente A foram adicionados em 90 ml de reagente B. Esta solução foi preparada todos os dias, e armazenada em gelo entre os usos.

Usando os reagentes acima, o ensaio é realizado conforme abaixo detalhado.

#### Amostra de Enzima

- 50  $\mu$ L de PGA (10,0 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0) foram misturados com 30  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 e 20  $\mu$ L da amostra de enzima e incubada a 40°C por 75 minutos. A 25 mL desta mistura de reação, 125 mL da solução de trabalho foram adicionados. As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 99°C. Após resfriamento, as amostras foram analisadas através da medição da absorbância a 410 nm ( $A_{410}$ ) como  $A_s$  (amostra de enzima).

#### Branco do substrato

- 50  $\mu$ L de PGA (10,0 mg/mL em tampão de acetato de sódio 2 M pH 5,0) foram misturados com 50  $\mu$ L de tampão de acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 e incubados a 40°C por 75 minutos. A 25 mL desta mistura de reação, 125 mL da solução de trabalho foram adicionados.

As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 99°C. Após resfriamento, as amostras foram analisadas através da medição da absorbância a 410 nm ( $A_{410}$ ) como  $A_{SB}$  (amostra de branco de substrato).

#### Cálculo de Atividade

A atividade é calculada como a seguir: determinar a atividade de poligalacturonase por referência a uma curva padrão de ácido galacturônico.

$$\text{Atividade (UI/ml)} = \Delta A_{410} / SC * DF,$$

onde  $\Delta A_{410} = A_s$  (amostra enzima) -  $A_{SB}$  (branco de substrato), SC é a inclinação da curva padrão e DF é o fator de diluição da enzima.

O  $\Delta A_{410}$  de Pgx1 (CL 10.389) foi encontrado como sendo 0,78 com uma DF de 1 para enzima produzida em culturas de placa de microtitulação. Nenhuma curva padrão foi analisada, portanto, nenhuma atividade de confiança pode ser calculada. A única conclusão a tirar é que a enzima mostrou-se ativa para o ácido poligalacturônico e, portanto, sugere-se que se trata de uma poligalacturonase.

A análise funcional desta proteína foi descrita no pedido de patente internacional WO 2009/033071.

Exemplo 16: Expressão de um gene que codifica a xilanase CI com e sem o seu domínio de ligação de carboidratos: Xyl1

O gene que codifica Xyl1 (identificador CL00649) foi super expresso em CI cepa W1L#100.L  $\Delta$ alpl $\Delta$ chil $\Delta$ pyr5. Duas variantes Xyl1 foram produzidas: tanto Xyl1 de comprimento total ou Xyl1 sem seu domínio de ligação de carboidrato (cbd). Amostras de sobrenadante de cultura foram analisadas por SDS-PAGE e bandas de proteínas foram coradas com Coomassie Azul Brilhante (CBB) (Fig. 12). A proteína Xyl1 migra em cerca de 40 kDa, enquanto o seu homólogo menos CBD migra em cerca de 30 kDa. Fermentações em batelada alimentada padrões foram realizadas, o que rendeu 33g de proteína por litro de filtrado de fermentação, com base em um ensaio de determinação de proteínas Bradford. Atividades de xilanase destes filtrados alcançaram até 3.500 U/mL.

O ensaio a seguir é usado para medir a atividade de xilanase para arabinoxilano de trigo AZO. Este substrato é insolúvel em soluções tamponadas, mas rapidamente se hidrata para formar partículas de gel que são facilmente e rapidamente hidrolisadas por endoxilanases específicas liberando fragmentos solúveis marcados por corantes.

Reagentes

- Tampão acetato de sódio (0,2 M, pH 5,0) é preparado como a seguir. 16,4 g de acetato de sódio anidro ou 27,2 g de acetato de sódio \* 3H<sub>2</sub>O é dissolvido em água destilada de modo que o volume final da solução seja 1000 mL (Solução A). Em um frasco separado, 12,0 g (11,44 mL) de ácido acético glacial é misturado com água destilada para gerar o volume total de 1000 mL (Solução B). O tampão final 0,2 M de acetato de sódio, pH 5,0, é preparado pela mistura da solução A com B solução até que o pH da solução resultante seja igual a 5,0.

- Arabinoxilano de trigo AZO (AZO-WAX) de Megazyme (Bray, Irlanda, Cat. # I-AWAXP) é usado como substrato do ensaio. 1 g de AZO-WAX é suspenso em 3 ml de etanol e ajustado para 100 mL com 0,2 M de tampão acetato de sódio pH 5,0 usando agitador magnético. Etanol a 96% é usado para terminar a reação enzimática.

Usando os reagentes acima, o ensaio é realizado conforme abaixo detalhado.

Exemplo de enzima

- 0,2 mL de solução estoque 10 mg/ml AZO-WAX foi pré-aquecido a 40°C por 10 minutos. Esta solução pré-aquecida foi misturada com 0,2 mL da amostra da enzima (pré-aquecida a 40°C por 10 min) e incubadas a 40°C por 10 minutos. Depois de exatamente 10 minutos de incubação, 1,0 mL de etanol 96% foi adicionado e, em seguida, a absorvância a 590 nm ( $A_{590}$ ) foi medida como  $A_s$  (amostra de enzima).

Branco do substrato

- 0,2 mL de solução estoque 10 mg/ml AZO-WAX foi pré-aquecida a 40°C por 10 minutos. Esta solução estoque pré-aquecida foi misturada com 200  $\mu$ L de tampão acetato

de sódio 0,2M pH 5,0 (pré-aquecida a 40°C por 10 min) e incubadas a 40°C por 10 minutos. Depois de exatamente 10 minutos de incubação, 1,0 mL de etanol 96% foi adicionado e, em seguida, a absorvância a 590 nm ( $A_{590}$ ) foi medida como  $A_{SB}$  (branco do substrato).

Cálculo da Atividade

5 A Atividade é calculada da seguinte forma: determinar a atividade de endo-xilanase por referência a uma curva padrão, produzida a partir de uma endo-xilanase, com atividade conhecida para AZO-WAX.

$$\text{Atividade (UI/ml)} = \Delta A_{590} / SC * DF,$$

10 onde  $\Delta A_{590} = AS$  (amostra enzima) -  $A_{SB}$  (branco de substrato), SC é a inclinação da curva padrão e DF é o fator de diluição da enzima.

A análise funcional desta proteína foi descrita no pedido de patente internacional WO 2009/018537.

Exemplo 17: Expressão gene *abn2* que codifica arabinase 2 de CI

15 O gene que codifica *Abn2* (identificador CL03602) foi super expresso em CI cepa W1L#100.Δ*alpi*Δ*pyr5*. As amostras de sobrenadante de cultura foram analisadas por SDS-PAGE e as bandas de proteína foram coradas com coomassie azul brilhante (CBB). A proteína *Abn2* migra em cerca de 50 kDa (Fig. 13). Um padrão de fermentação em batelada alimentada foi realizado, que rendeu 7 g de proteína por litro de filtrado de fermentação, com base em um ensaio de determinação de proteínas BCA.

20 A análise funcional desta proteína foi descrita no pedido de patente internacional WO 2009/033071.

Exemplo 18: Expressão do gene *chi1* que codifica endo-quitinase CI

25 O gene que codifica *Chi1* (identificador CL06081) foi super expresso em CI cepa W1L#100.Δ*alpi*Δ*pyr5*. As amostras de sobrenadante de cultura foram analisadas por SDS-PAGE e as bandas de proteína foram coradas com coomassie azul brilhante (CBB). A proteína *Chi1* migra em cerca de 40 kDa (Fig. 14). Um padrão de fermentação em batelada alimentada foi realizado, que rendeu 12 g de proteína por litro de filtrado de fermentação, com base em um ensaio de determinação de proteínas BCA.

30 A análise funcional desta proteína foi descrita no pedido de patente internacional WO 2009/018537.

Exemplo 19: Expressão de um gene heterólogo: poli-galacturonase II de *Aspergillus niger*.

35 O gene que codifica poli-galacturonase II de *Aspergillus niger* (número de acesso X58893) foi expresso em CI cepa W1L#100.1Δ*alpi*Δ*chil*Δ*pyr5*. Após a fermentação a enzima foi purificada utilizando cromatografia de troca iônica e cromatografia por exclusão de tamanho. A endo-PGII purificada migrou em cerca de 40 kDa em gel de SDS-PAGE (Fig. 15).

Esta enzima heteróloga era funcional como foi mostrado pela atividade em ácido

poli-galacturônico utilizando o seguinte ensaio.

Ensaio de açúcares redutores: método PAHBAH

Soluções Estoque:

- Substrato: 1% (p/v) de ácido poligalacturônico em H<sub>2</sub>O.

5 - Reagente A: Ácido p-hidroxibenzóico hidrazida (PAHBAH) (10 gramas) é adicionado a 60 ml de água e misturado. A este é adicionado 10 ml de HCl concentrado e o volume é completado até 200 ml.

10 - Reagente B: Dissolver o citrato trissódico (24,9 g) em 500 ml de água, adicionar cloreto de cálcio (2,20 g) e dissolver, adicionar hidróxido de sódio (40,0 g) e dissolver. Ajustar o volume para 2 litros. A solução deve ser clara. Ambos os reagentes foram armazenados em temperatura ambiente.

- Reagente de Trabalho: Adicionar 10 ml de reagente A em 90 ml de reagente B. Esta solução foi preparada todos os dias, e armazenada em gelo entre os usos.

Ensaio:

- 15 1. 50 µL de substrato  
 2. 30 mL 0,2 M HAc/NaOH pH 5,0  
 3. 20 µl de amostra / enzima (microplaca não diluído; fermentador >20 x diluída)  
 4. Incubar a 37°C por 10 minutos  
 5. 25µl de mistura do ensaio + 125 µL de Reagente de Trabalho (em microplacas  
 20 de PCR) ou 50µl de mistura do ensaio + 250 µL de reagente de trabalho (em tubo de 1,5 ml)  
 6. Aquecer a 99°C por 5 minutos em Thermal PCR Cycler (microplaca de PCR) ou em água fervente (tubo de 1,5 ml)  
 7. Transferir de 100 µl para microplaca NUNC e medir a extinção a 410nm

25 Exemplo 20: Geração de misturas de enzimas artificiais para sacarificação eficiente de biomassa vegetal.

Uma mistura de enzima artificial foi criada pela mistura de proteína bruta CI UV 18 25Δalpl com proteína bruta a partir de cepas brancas que expressam CI-β-glicosidase BglI, CI-arabinofuranosidase Abf3 e Abn7, CI-xilanase Xyl2 e CI-β-xylosidase BxII, sendo  
 30 WLL#100.LΔalplΔpyr5 [BglI/pyr5], WLL#100.LΔalplΔchilΔpyr5 [AbO/pyr5],  
 WLL#100.LΔalplΔchilΔpyr5 [Abn7/pyr5], WI L#100.LΔalplΔpyr5 [Xyl2/pyr5], e  
 WLL#100.LΔalplΔchil [BxII/AmdS], respectivamente. A relação entre os diferentes componentes em uma base de proteína foi de 10 (UV18-25Δalpl): 1 (proteínas de cepa branca).

35 A eficiência de sacarificação da proteína bruta da UV18-25Δalpl só foi testada no substrato farelo de trigo e em comparação com a eficiência da mistura artificial. 10 mg de proteína/g de farelo de trigo de matéria seca foram utilizadas. As condições s foram as seguintes: temperatura 50°C, pH 5,0, o tempo de 72 horas.

Foi demonstrado que a mistura de enzimas a partir UV18-25Δalpl sozinha liberou

aproximadamente 30% da glicose, aproximadamente 5% da xilose e 12% da arabinose do farelo de trigo. A mistura artificial liberou pelo menos 60% da glicose, 60% da xilose e 25% da arabinose do farelo de trigo.

Exemplo 21: Construção de bibliotecas de genes em cepa C1 branca W1L#100.1Δalp1Δchi1Δpyr5 e triagem de xilanases.

Uma biblioteca de genes de DNA genômico de C1 cepa UV 18-25 foi construído em cepa C1 W1L#100.1Δalp1Δchi1Δpyr5 pelos métodos descritos anteriormente por Verdoes et al. (2007). A biblioteca foi triada para atividade de xilanase como descrito no Exemplo 4 no capítulo 4, que gerou vários clones positivos que expressaram diferentes xilanases. Análise de SDS-page revelou a presença de bandas de proteína extras nos clones positivos. PCR usando diferentes combinações de primers com base na sequência de xilanases C1 conhecidas e o vetor de sequência revelou a presença de três diferentes C1-xilanases. Este resultado foi confirmado pela análise de Southern.

Apêndice 1 dos Exemplos: Procedimento de mutação UV para cepas C 1

1. Espalhar a cepa parente em placas PDA (agar dextrose batata) e incubar a 35°C por 14 dias para obter esporos.

2. Raspar os esporos em salina 0,9% e filtrar através de algodão para remover micélios. Diluir a suspensão resultante de esporos de  $1 \times 10^6$  esporos/ml, utilizando solução salina. Remover uma pequena alíquota da suspensão de esporos, diluir em salina e espalhar em placa PDA para determinar a contagem de esporos viáveis inicial.

3. Adicionar 10 ml de suspensão de esporos a uma placa de Petri de vidro estéril contendo um clipe de papel e agitar em uma placa de agitação magnética. Remover o tampo de vidro e irradiar com luz UV para obter 90-99,9% de morte. Usar uma lâmpada Pen-Ray como a fonte de luz UV (254 nm) e aquecer por pelo menos 10 minutos antes de irradiar a suspensão de esporos.

4. Espalhar a placa para placas seletivas ASC (Apêndice 2 dos Exemplos) com luzes da sala apagada, usando um volume para obter menos de 30 colônias em cada placa.

5. Inverter as placas, colocar em sacos de plástico vermelho e incubar a 30°C por 6-7 dias para crescer e permitir que as zonas clareadas se desenvolvam.

6. Determinar o % de morte para a mutação como a diferença entre a contagem de placa inicial viável e uma contagem de placa em PDA após a irradiação UV.

Apêndice 2 dos Exemplos: Meio

*Placas de Agar ASC Seletivas*

Componente	Quantidade	
Água deionizada	800	MI
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	G
KCl	0,1	G

NaCl	0,1	G
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3	G
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,016	G
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,9	G
20g/l ASC	200	MI
Noble Agar	15	G

Ajustar o pH para 7,5 com HCl e esterilizar 30 minutos a 121°C. Após a esterilização adicionar 20 ml de 25 g/l de DOC (ácido deoxicólico), estéril filtrado. Verter cerca de 20 ml/placa. Espalhar os esporos mutados com UV para as placas ASC e incubar por 7-14 dias para permitir o crescimento de colônias e limpeza de celulose.

5 *Meio RM-ASP*

Componente	Quantidade	
Bacto Peptona	2	g
Extrato Bacto Levedura	1	g
50x AspA(+N)	20	mL
Glicose	10	g
1000x elementos traços	1	mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,493	g
Água	Avolumar para 1L	

Ajustar o pH para 6,5 antes da autoclavação. Esterilizar glicose separadamente como uma solução a 50%.

50x AspA (+N)		
Componente	Quantidade	
NaNO <sub>3</sub>	300	(ou g
(ou(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	233)	
KCl	26	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	76	g
KOH 10 N	22,5	mL
Água	Avolumar para 1L.	
1000x Elementos traços		
Componente	Quantidade	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,2	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,1	g

MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,427	g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,17	g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,16	g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15	g
EDTA	5	g
Água	Avolumar para 1 L	

*Meio de celulose de baixa e alta densidade*

Componente (g/L)	Meio de celulose de baixa densidade (#1)	Meio de celulose de alta densidade (#2)
BisTris	15,7	15,7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,22	0,66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,08	0,24
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4	12
Na <sub>3</sub> Citrato.H <sub>2</sub> O	4	12
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,03	0,09
CaCl <sub>2</sub>	0,4	0,8
Extrato de Levedura	0,05	0,15
Pharmamedia	5	15
Lactose H <sub>2</sub> O	5	15
Celulose	2080	

Ajustar a pH 7,0.

sequência *chi1*: Vide WO 2009/018537.

Sequência de pep4 DNA (SEQ ID No 19):

5 1 gctggctcaccgttattgctccccgcaggaagtccaggtcctcctcgcagttggacaaac  
61 tctgcttcgacgctgcaacttgactcaaggagcgctcggcctcgtcgattgggtaag  
121 acagcatgacgttggcctgccaaatgtcagcctctagaagcacactcccactctcgttgg  
181 aaaggttctaccccaagccacaagtaaacctcgtccgtcggcggtatctcggccttcgc  
241 atagagagtgctgtcaattcgaatgtgtctctatcggatcagattcgcctgccacaa  
10 301 tcaaccgccgatcagcaccatggccgctcatcgagagtggaacgcctcgcctaccgctc  
361 ctgagctcaaaaagcggacagcctccagcgtttccgaatgtcgggcattttgtccttt  
421 agtcccgctaccctccgctgcagggtctgctccatgaactggatttctcgcacgcccac  
481 cacgtatcagccgaacgcgctccgtcaaggctggatttcaatcttaaccgggagagctca  
541 cgcaatcatctcttgaaccgacgcagcgtcggctcaacatctgctcgtgacgtgacata  
15 601 gtccctgaccttctgacgaatggcgcatacggaatgccacgaggattggaggggtgtgce  
661 gtccctgtctcgtgcagggtcagtcagcaataacagccagagtgcatatgctagaatg

721 gcgcccgcgggggagggaaagtgtggttaccttgctgctgcttccctgtctgctgctgccc  
 781 atcttgacaaaattctcacatgtgacagtggaaggatactgcaagcgactgtaaccoga  
 841 gccaacggagtgacgfcgggttggttacctagtttaggcaagccgttctcaagctgctg  
 901 gccaaaaaattcatggcgggttcgagtgggcagcgaggactcctcgtagggagcaagggtg  
 5 961 aagatgtgggtagcaggggtcgacgctacaaagfactttgtatccggattgctgtgtgg  
 1021 tacgaagcgcocgtgtgttgatgctctctgtatgtacggagtagtctacctttccat  
 1081 gcgctgccccattctctatfttggtgcacctgctcgtctgtagtgtatgtacagcagta  
 1141 caactatctacgacacctgcactgactagtgcgtagaattcttagttctcgagtaogg  
 1201 cgctaacgcttcgocgagcaagcaccttctctgattgtgtactgtgctcaaacctgcg  
 10 1261 cagccagctcgggtgctccacaagcccggccggtgcccaccgccatttgcacccgggtcc  
 1321 catgaatctgtggacgacccatccctctctgaccgctgcgggtacagcccagaatga  
 1381 tagcgggaagacaaacgcagtgattcggattaogctcgcaggaaatggggggagtagctt  
 1441 gatagctctccacggcgaggggtgctcaggctgagggtgcaactagttgtatgtacactc  
 1501 aggacgaggcattctcgttttgaacaccaatctccaataccggagggtgtgtatgca  
 15 1561 ggatcaactgaaatgtttgcacccattaitactgactctggatgattcggacagggcga  
 1621 gcatgattggtcggccgtttgtcaccgcattcgcagcgtcggcgggaagcagccaagt  
 1681 agagcaactgccaacgfttcaagagacaccccatalggaglaaatggagtaactctgtat  
 1741 cctcagagccgccaatcaaactatgtttctcagcaggatggccogtgcacatggggg  
 1801 atgtaccctggtaggtagttcgtgtgtatgacttccctggatgagcctgctgcgcatga  
 20 1861 aggtgcggggccccaggttgggtgcctaaaactaactgtaaacagacgcacggtggcga  
 1921 cgacgtagccgaaccgggtgtagcagcttccccggccactaogtaacggggcgatgca  
 1981 ctgcaggaacacctcacacctgacctaccccctcgcctccgcatccgtcccaaccogct  
 2041 tccccaacctttccatcaactacttccgagactcgacatcaccttttcgogtctgtctc  
 2101 atcgtcgttatcatcaccaatcggcgatagattgttcgcttcgatcgtcgcacogccttg  
 25 2161 acttccattcgtcctcaogccgaccgaccgaccagacagtcgccccaaaATGAAGGATG  
 2221

CTTTTTGCTGACCGCAGCTGTGCTGCTCGGCTCCGCCAGGGAGCAGTTCACAAAAT  
GA

2281

30 AGCTGCAGAAGATCCCTCTCTCTGAGCAGCTTgtacgtctgaccccgttcaagcacgct

2341

cagcggctactgaccttatcgcgtccagGAGGCGGTTCCCATCAACACCCAGCTCGAGCA

2401

TCTCGGCCAAAATACATGGGGTTGCGCCACGTGAATCTCAAGCCGATGCCATCTTTA

35 A

2461

GGGCATGGTTGCCGACGTCAAGGGCAACCATCCTATTCCCATCTCCAACCTTCATGAACG

C

2521 ACAGTgtatgtgacgccactgtgggtggcatggatggctogtcctcaattcggagactgac

2581

actggagcaccclagACTTCTCCGAGATCACGATTGGAACACCCCCTCAGTCATTCAAGG

5

2641

TGGTCCTCGATACCGGTAGCTCCAACCTGTGGGTTCCATCAGTCGAGTGCGGCTCGAT

TG

2701

CTTGTTACCTGCACTCGAAGTATGACTCATCTGCCTCGTCCACCTACAAGAAGAACGGA

10

A

2761

CCTCGTTTCGAGATCCGCTACGGGTCAGGCAGCCTGAGCGGGTTTGTCTCTCAGGACAC

AG

2821

15

TGTCCATCGGCGATATCACTATCCAGGGCCAGGACTTTGCCGAGGCGACCAGCGAGCC

CG

2881

GTCTTGCCTTTGCCTTTGGCCGTTTCGACGGTATCCTTGGCCTTGGCTACGACCGGATC

T

20

2941

CAGTCAACGGCATCGTCCCGCCTTTTTACAAGATGGTCGAGCAGAAGCTCATCGATGAG

C

3001

CCGTCTTCGCCTTCTACCTGGCCGATACCAATGGCCAGTCTGAGGTTGTCTTTGGCGGT

25

G

3061

TTGACCACGACAAGTACAAGGGCAAGATCACCACCATTCCGTTGAGGCGCAAGGCCTA

CT

3121

30

GGGAGTTGACTTCGATGCCATTTCTTACGGCGACGACACTGCCGAGCTTGAGAACAC

TG

3181

GCATCATCCTGGACACCGGTACTTCTCTGATCGCTCTGCCCAGCCAGCTCGCCGAGAT

GC

35

3241

TCAACGCTCAGATCGGCGCTAAGAAGAGCTACACTGGCCAGTACACCATCGACTGCAA

CA

3301

AGCGCGACTCCCTCAAGGATGTCACGTTCAACCTGGCTGGCTACAATTTACGCTCGG  
CC

3361

5 CCTACGACTACGTTCTCGAGGTCCAGGGCAGCTGCATTTCTACCTTTATGGGCATGGAT  
T

3421

TCCCGGCTCCTACTGGGCCACTTGGGATCCTGGGCGATGCCTTCCTCCGGAGGTATTA  
CT

10

3481

CCATTTATGACCTTGGCGCCGACACCGTCCGGTCTGGCTGAGGCCAAGtgattgaaggatg

3541 ggcggcagggaaagacgatgggtaatacggggagfctgggaatcgggcttggactlgg

3601 tcigtatctagttgctcaagagagttgctgttggatttggatataggatctgtctaggaa

3661 ccttagcaggagtgaaatitttctgtgtagcagcatcggcggctgaagtggttgataa

15

3721 caagtctggacttgagtacgcaggcagttgcacaatctgcttcgocgaggagagcaaagg

3781 cgtcctcttggaaaagcctacctacgcgtcacaggggtataatitttggagttgacct

3841 acgcccgtcccataccaaccgcgtcccaatccccgtaacccttgcaatgctattacc

3901 gtggatgtatcaagtagcagaagccgacatcccacacgcctcaaccttctatccagaca

3961 atgacatggtaagctcatttttaaggtcgccgtcctccctccctcagctgattcatt

20

4021 ttcttgcgccttggcgcacccccgacttcaatgcccgtacggatcaaaggggtgcaaac

4081 ttgccccgacctctttctgcgcacatcatcaccatcatcgccgttggctgcctgc

4141 gcagcatgtagcacggacgacgccttgcctgtagtcaaacggctcctgctoggcacgtca

4201 tcatggccttctctctgttcgcccagggtctgtctgctgctgctgctgctgctgctgctg

4261 gcagatgtctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg

25

4321 gccttctggttgagccttgagttcttctgctcccttatgtctccgcttggagccagt

4381 tgctctgccaagagctgagcacgccttgaactctctcgagcagccttctggcttgttc

4441 ttgcctgctggcggcctgtcatcaccaccctcaacttctgctogacactaggagac

4501 ttgggtggtcttgcctgcggaactatctccaccatctcgatgtcgaaactgcttcg

4561 get tcggat getgactcaacatcaacat cct agactccgcttlogaccagcctcaga

30

4621 gtgaaaccttctctogagaacagggagaccttgggtcttgttcagcagacgcgctg

Sequência de aminoácido Pep4 (SEQ ID No 20):

1 MKDAFLLTAA VLLGSAQGAV HKMKLQKIPL SEQLEAVPIN TQLEHLGQKY

MGLRPRESQA

61 DAIFKGMVAD VKGNHPIPI NFMNAQYFSE ITIGTPPOSF KVVLDTGSSN

35

LWVPSVECGS

121 IACYLHISKYD SSASSTYKKN GTSFEIRYGS GSLSGFVSQD TVSIGDITIQ

GQDFAEATSE

181 PGLAFAFGRF DGILGLGYDR ISVNGIVPPF YKMVEQKLID EPVFAFYLD  
TNGQSEVFG

241 GVDHDKYK GK MTTIPLRRKA YWEVDFDAIS YGDDTAELN TGIILDTGTS  
LIALPSQLAE

5 301 MLNAQIGAKK SYTGQYTIDC NKRDSLKDVT FNLAGYNFTL GPYDYVLEVO  
GSCISTFMGM

361 DFPAPTGPLA ILGDAFLRRY YSIYDLGADT VGLAEAK

Sequência de DNA his2a (SEQ ID No 21):

1 cattcatggg ttgaggccc gatttgaac gtataccta ggctatattc ggggtaagat  
10 61 actggaagcg ctgggccgga tgactagcta ttcaagtgc ccaagagccc atcacaccta  
121 actgtggcc taagatctag ccaaatcatt cattggttac ccagactcg acgaacctga  
181 tattcgaatc cagggaagc caaatgccg agtaagactt gacaaacccg gaacccaaga  
241 actgcgcaat ctgggagcag gttccgacc agcatggaaa cccccgatg gaaaaccac  
301 acatacgggg atggggacta acgccggaca aatcaaaaac cctggaggat tggtaacga  
15 361 tggggaagtg cgacgggca ccaacccctc aagcgttgca ggacctgta cagccaagca  
421 gaatgacgga aaccgatgag caaacccgga atctgatgat cctggaacag aatcactgt  
481 ctgggtacc gacgttgag tgagagtg caaattagca ggatcaagca actatactac  
541 ctaaatcagg tcgatcagtt atcagccctt gcaaaccaga ctgatggag ggaagagg  
601 aaagctgta ttgaggagg aagctgagaa ttggtgggg ttgtttgt cagccagggt  
20 661 gtaggacgag aagaacgct tcgagattc ggagagcagg ctgtcctaga gcattattt  
721 cctggcctg agcaacta agccagttt tttccccc tegggagga agtcgcttg  
781 aattgaagc ttgcccgc agagctggc tcataagca tccaatcaa tgagcctgaa  
841 gcagtcgacc gatttttt latctgggt taatcgcaac catgcacata accgcttg  
901 gactagctcc aacagctcc atcaacaacc tgagaaaggc gcgagtgatc cgtatccca  
25 961 cacccttac cgaaaactac ttaactccca cctccccac cgccgggcaa ctcttcaa  
1021 ctcccactca accaactcc gtttcccat caatcactgc atcgcgct caagctctc  
1081 ctgccccta caccaaccac ataactttt latccttga caaggacct caatcaaaAT  
1141 GACTGGCGGC GGCAAGTCCG GTGGCAAGGC GAGCGGTTCC  
AAGAACGCGC AATCgtaggt  
30 1201 gccctttcg cgtcatctac ccgcgcttc gtcagttgg gcalggtca gccitgaact  
1261 ccagatgccc gttccggtgc tcttacagtt ggctaacttt ttgtagTCGT TCATCTAAGG  
1321 CCGGTCTTGC GTTCCCTGTC GGTCGTGTCC ACCGCCTTCT  
CCGGAAGGGC AACTACGCCC  
1381 AGCGTGTCGG TGCCGGTGCT CCCGTTTACC TGGCTGCCGT  
35 TCTCGAGTAT CTTGCCGCTG  
1441 AAATTCTGGA GCTGGCTGGC AACGCCGCTC GCGACAACAA  
GAAGACGCGT ATCATCCCGC

1501 GTCACCTTGCA ACTCGCTATC AGGAACGATG AGGAGTTGAA  
CAAGCTTCTC GGGCACGTCA

1561 CCATCGCCCA GGGTGGTGTG CTTCCCAACA TCCACCAGAg tacgttgct  
taccagacga

5 1621 tctctaatgc gcaaactaa ctttgttcc agACCTTCTG CCGAAGAAGA  
CCGGCAAGAC

1681 CGGCAAGAAC TTGTGCGCAGG AGCTCtgatt ttcgoggttg ggttttttg ctttatttc

1741 tggctggcac gctgggttca tgatacggg gtcacggttt cgggtcattg gttgctttt

1801 ggcgctgttt gggctgtaca ttaattccat gatgggcatg gtcattgta tgaatgagaa

10 1861 taccctctga acatccaaat cctgacacag ttgctcgag ttgatgctg cattggaagc

1921 gactcgttga cggtaaccg tagagcttg tgccttacga aattcttga tgcacagat

1981 taccagtag tgccatagta ctcttaaga tgataagtc atttgagccc ggcacgcac

2041 agactttccc atgcctgat atatgcaat tctatgtac aagagattcg tgcgaaaga

2101 gccgctaaa actgagcgg ggggggagct gcaaaagcct gtcagctaat tgcagtgaga

15 2161 cgcgcaaagc aagccaactt acgatccagg tggggcgccg ggaggttct ctgatttcc

Sequência de aminoácido His2A (SEQ ID No 22):

1 MTGGGKSGGK ASGSKNAQSR SSKAGLAFPV GRVHRLLRKG NYAQRVGAGA  
PVYLAHVLEY

20 61 LAEILELAG NAARDNKKTR IIPRHLQLAI RNDEELNKL GHVTIAQGGV  
LPNIHQNLLP

121 KKTGKTGKNL SQEL

Sequência de DNA hex1 (SEQ ID No 23):

1 gtcaacttactccgagctcgatcgaggtcgatactgagcaccgtactcacaactccgt

25 61 cattgacgttctgagggcgagtalctgcccgtgccagcccaaccaaccgcaagcaagc

121 ttccgtagtcggtaaccaccgtcaacggatcgcggtcagccacagccgcaaggccagcag

181 caccacctccaccacaccgacgagtaaccgctgatccccctagccaccgcccctcta

241 caagaaggagtcggttgaagtcgccgtaccactgttgacccccctgctcctctctgac

301 ctaccacgagcagggaacattgttgaagagaccgttgacgctcaccgttacgctcctca

361 acccaacaacaacaacaagATGGGCTACTACGACGAGGACGgtaagcatcttcttcccc

30 421 ttgtatgttctccttaccggtgacatccatcggtctgtatgcttcttagccacacaaa

481 gtgttgacaagtgccgtgctcaogccgatalcagGCCACTACCACTCTTTCCGCCATG

541

GATTGCACAAGTTGGCTGACCGTATTGCGCATCCTGAAGGCCATGACCGCGTTGAGGT  
GA

35 601

GCGAGGTTTCGTGAGACCCGCGCACCCGCGCTCCGTCTTCGGAGGCGTACACGCCGA  
ACA

661

CGGTCACCATTCGGTGCCACCACATCCGCCTCGGCGACATCCTGATCCTCCAGGGCCG  
CC

721

5 CCTGCCAGGTCATCCGTATCTCGACCTCGGCTGCCACTGGCCAGCACCGCTATCTTGG  
TG

781

TCGACCTCTTCACCAAGCAGCTCCATGAGGAGTCGTTCGTCTCGAACCTGCTCCC  
A

10

841

GCGTCGTCCAGACGATGCTTGGCCCTGTTTTCAAGCAGTACCGCGTCTCGACAT  
GC

901

15 AGGACGGCCACATCGTCGCCATGACCGAGACGGGCGATGTCAAGCAGAACCTGCCCG  
TCA

961

TCGACCAGAGCAACCTCTGGGGCCGCCTCAAGCAGGCCTTCGAGACTGGCCGCGGCA  
GCG

1021

20 TCCGTGTCCTGGTCGTTTCTGACAACGGCAACGAGATGGCTGTTGACATGAAGGTCGTC  
C

1081 ACGGCTCGCGCCTCTAAgtcaagccggcaggcttcatgcaagcttggggctacgagtc

1141 gggcgccattgggttgcgtttagtgcactcttggttacggcgtgatgtcatttgaagat

1201 taaaagctgcgcttggctgactcctggcgccgatggatatacatgttctcgggagga

25

1261 tafgaaggttcatgtcgttagttcacgigtatataatgactgfaalgatggaigt

1321 atggccaactttcgattgatacttgaacctttttctggtcgtgagtgaaacagtg

1381 ttaagtgagagtgaggtatgcaccgttatcacaagggtgcctgatatcccacctcaa

1441 cggcggtggggaatcgaagtcctcccctacagtaagtagcctctctgaatgatctgaa

1501 acgcaaccctcogagccactaccacacctaactacgaaacaaccacttctgttccag

30

1561 gaagctccagttctccgctacct cccct cccgcttcaggttgaagct tat ct ccc

1621 aaactcatctcogagaggtctaatccgtacacacttaacagtgcatcctgacatagctaa

1681 ccatcatcactctagttcattagccgtcccgccatcccgtcaattacattcccggctgt

Sequência de aminoácido Hex1 (SEQ ID No 24):

1 MGYDDEDGHY HFRHGLHLKL ADRIAHPEGH DRVEVSEVRE TRRTRAPSSE

35

AYTPNTVTIP

61 CHHIRLGDIL ILQGRPCQVI RISTSAATGQ HRYLGVDLFT KQLHEESSFV

SNPAPSVVQ

121 TMLGPVFKQY RVLDMQDGI VAMTETGDVK QNLPVIDQSN LWGRLKQAFE  
TGRGSRVRLV

181 VSDNGNEMAV DMKVVHGSRL

bgII : vide WO 2009/018537. Notar que bgII = Bgl3A.

5 xyl6: vide WO 2009/018537.

cbhI : vide WO 2009/018537. Notar que cbhI - CBH1a .

PchII(0.8) (SEQ I No 25):

AGCTTGACCCTTTCAGAGCTAGGTTTCATTAGGCCTTCGAAAACAACCCAAGGC  
CCCGTC

10 GCAACCATCACAACCGGCCGATAACCAGATCTCGGTAGGTCCGATAAGGATCCAAAATG  
G

TGTCGGCTGACGTTGCATGTGCCCAGGCAGGAGGATGATCCCCAGGGTTGTTGCCGGC  
AG

15 CTCCCGCACGTGGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGAAAGCCCTAACTAACGTTTCGTTCT  
ATC

ACGGGCCGACCGGGCCATGCTTTCGGCTTGTGAGCGGTGGGGTCAAGGGCAACAAGA  
AAT

GCTAAGTGCGGGACGAAGACACGCGGGCATGAGGTCTCAGGGTGACCTGCGCAAAC  
CAA

20 GTCCCACTCGCCATGCCTCCAGCAGCAACGTTGCCGTAGAAGGGTCAAGGGGGTTTGT  
GT

AGACCCACGACCATGCTGCCGGCGAGCGGAGGGTTGGCTTGCTACAGGCGCTGAAGG  
GTC

25 AACTCGGTGCCCAAAGTGGCTACCAAGCGTGCCATCAAGGGAAATGAGATGATGGTGG  
CT

CGTGGGCAAAGAAAAGACAAGGGAGGTGACTCTAGAGAGATGCTCTCGAGTTCACGGG  
TA

TAAGAGCACTGTGATCGTTCACAAAGCCGGCGTACTCCTCTAGAGCATCTATCATCAAC  
A

30 TCACCAGAAAGGTCNTAGACCAGGTGGTTGCCATATCCAGTCGCAAAGAGCCAAAGA  
GC

GAAGGAGCACGAAAGCACAGCCCAATCATTCCCTGCTTTGCTACTTCTTCTCCACCATG

PchII(1.8)(SEQIDNo26):

GTCCCTTACCTATGGGCTCCTAGTCTCGTTCCTCTTTTTGATAGATTTGTATTTT

35 GCAAC

GTTGCAAATGAGACATTTCAATCATATGTAGCCGCCAGCTACTGTTAGCGTACTCAGC  
G

TTGCCCAAACGGCGGTTTTCTGGGTAGCACTGTGCCGCGTGCCCCTGAGCCGTGCGT  
CG  
CGGAAACCCCTTAAGTAGCAAGTATGTTACCGCCGAGACCGACAATGCTGTTGGTTAC  
C  
5 TCGCTGGTCCATGATTGCAATCTAGATATCGTGCGGGGCTTTTGCAATCGGTTTTCCCT  
A  
CCCCTTTCTTCTTTTGGACACTTTCTCTTTTGGAAAATGCCGAAATGATGCGGCTCGCT  
CACGCCCCGAAGTCCCAGCTGGGGCTAGATCCGTGATTGCAACGCGGTGCGAACGC  
GAC  
10 TGGGGCAGACCTCGCTCAGCCTTGGTCGTGCCGGAATGGCGGGTACCTTACCAGGTC  
GG  
GATCAATTACATAGGATGCCATGTGCGTGGATTTGATTGCATCGCTGTCCCTTTTGTATG  
TGTCCGAGAGCGAGACATCAACGCGAAAACCGGAATGCTCCCAACGTCGCTCTCTGTT  
CA  
15 TAGGGTCTTTTTTTTTCTTCTGCTCCATATCATCTGTCTTGA ACTAAGTGATCATCTGCT  
GTCACGTCCCGCCCAATGATTGTAAAGAATGATAAGTGATGCTCGCCGGGGCCAGGCT  
CT  
GTGAAAGTTCCCTCTTTGGTTGACGATCAGGTAGCGCCAACGTTGATTGGGCCGCCCG  
TA  
20 AAATCCGACCCTGTCTCCTTTCGTTGCAAGTCTCCGCGAGACCGTGCCAAGCATGTTCT  
C  
CGGATCCCTCAATTACATAAGGTTTGGCTCCAGGGTAGGTCTGGAAGCTACCCACCTCG  
G  
CCAAGCAACCAATCACAACCAGACCTCGCGGCGTTTCGACCTTCTGGTTTGTCTCAGG  
25 G  
CTGGCCAACGTCCTCCCGTGGCGGGTGCTGGTGATCGCAGGTGCGAGGCGAGTGCC  
GGG  
CACGCGGAGCCCCCGTCAAAGCTTGACCCTTTCAGAGCTAGGTTTCATTAGGCCTTCGA  
A  
30 AACAAACCAAGGCCCGTCGCAACCATCACAACCGGCCGATAACCAGATCTCGGTAGG  
TC  
CGATAAGGATCCAAAATGGTGTGCGGCTGACGTTGCATGTGCCAGGCAGGAGGATGAT  
CC  
CCAGGGTTGTTGCCGGCAGCTCCCGCACGTGCGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGAAAG  
35 CCCT  
AACTAACGTTTCGTTCTATCACGGGCCGACCGGGCCATGCTTTCGGCTTGTGAGCGGTG  
GG

GTCAAGGGCAACAAGAAATGCTAAGTGCGGGACGAAGACACGCGGGCATGAGGTCTCA  
GG  
GTGACCTGCGCAAACCAAGTCCCCTCGCCATGCCTCCAGCAGCAACGTTGCCGTAG  
AA  
5 GGGTCAGGGGGTTTGTGTAGACCCACGACCATGCTGCCGGCGAGCGGAGGGTTGGC  
TTG  
CTACAGGCGCTGAAGGGTCAACTCGGTGCCCAAAGTGGCTACCAAGCGTGCCATCAAG  
GG  
AAATGAGATGATGGTGGCTCGTGGGCAAAGAAAAGACAAGGGAGGTGACTCTAGAGAG  
10 AT  
GCTCTCGAGTTCACGGGTATAAGAGCACTGTGATCGTTCACAAAGCCGGCGTACTCCTC  
T  
AGAGCATCTATCATCAACATCACCAGAAAGGTCNTAGACCAGGTGGTTGCCATATCCAG  
T  
15 CGCAAAGAGCCAAAGAGCGAAGGAGCACGAAAGCACAGCCCAATCATTCCCTGCTTT  
GC TACTTCTTCTCCACCATG  
PhexI (SEQ ID No 27):  
GATCCTAAGTAAGTAAACGAACCTCTCTGAAGGAGGTTCTGAGACACGCGCGA  
TTCTTCT  
20 GTATATAGTTTTATTTTTCACTCTGGAGTGCTTCGCTCCACCAGTACATAAACCTTTTTT  
TTCACGTAACAAATGGCTTCTTTTCAGACCATGTGAACCATCTTGATGCCTTGACCTCT  
TCAGTTCTCACTTTAACGTANTTCGCGTTAGTCTGTATGTCCCAGTTGCATGTAGTTGAG  
ATAAATACCCTGGAAGTGGGTCTGGGCCTTTGTGGGACGGAGCCCTCTTCTGTGGT  
CT  
25 GGAGAGCCCGCTCTCTACCGCCTACCTTCTTACCACAGTACACTACTCACACATTGCTG  
A  
ACTGACCCATCATACCGTACTTTATCCTGTTAATTCGTGGTGCTGTCGACTATTCTATTT  
GCTCAAATGGAGAGCACATTCATCGGCGCAGGGATACACGGTTTATGGACCCCAAGAG  
TG  
30 TAAGGACTATTATTAGTAATATTATATGCCTCTAGGCGCCTTAACCTCAACAGGCGAGCA  
CTACTAATCAACTTTTGGTAGACCCAATTACAAACGACCATACGTGCCGGAAATTTTGGG  
ATTCCGTCCGCTCTCCCAACCAAGCTAGAAGAGGCAACGAACAGCCAATCCCGGTGC  
TA ATTAATTATATGGTTCATTTTTTTAAAAAATTTTTCTTCCCATTTTCTCTCGCTT  
TTCTTTTTCGCATCGTAGTTGATCAAAGTCCAAGTCAAGCGAGCTATTTGTGCTATAGCT  
35 CGGTGGCTATAATCAGTACAGCTTAGAGAGGCTGTAAAGGTATGATACCACAGCAGTAT  
T  
CGCGCTATAAGCGGCACTCCTAGACTAATTGTTACGGTCTACAGAAGTAGGTAATAAAA

G

CGTTAATTGTTCTAAATACTAGAGGCACTTAGAGAAGCTATCTAAATATATATTGACCCT  
AGCTTATTATCCCTATTAGTAAGTTAGTTAGCTCTAACCTATAGATAGATGCATGCGGCC  
GCAGGTACCAGGCAATTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTC

5 GT

TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCAC  
A

TCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA  
CA

10

GTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGC  
GGG

TGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCT  
TT

CGCTTTCTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATC

15

G  
GGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTG

A

TTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGA  
C

20

GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCC  
TATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTTAAA

AAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAATATTAACGCTTACAAT

TTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATA  
CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGA

25

AAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGCA  
TTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGAT

CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGA  
G

AGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC

30

GCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATT  
CT

CAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC  
A

GTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACT

35

T

CTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATC  
AT

GTA ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC  
GT  
GACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA ACTATTA ACTGGCGAACT  
A  
5 CTTACTCTAGCTTCCCGGCAACTVATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATTVTVAGTTGC  
AGGA  
C CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG  
GT  
GAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA  
10 TC  
GTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC  
T  
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATA  
CTTTAGATTGATTTAAA ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT  
15 GATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC  
GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG  
CAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC  
T  
CTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGT  
20 G  
TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT  
G  
CTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA  
C  
25 TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGC  
ACA  
CAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTAT  
GA  
GAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG  
30 GTC  
GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTC  
CT  
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC  
GG  
35 AGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCC  
T  
TTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCC

TTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA  
GC  
GAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATT  
CAT  
5 TAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA  
TT  
AATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGT  
ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGA  
T  
10 TACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCG  
GT  
GGCGGCCGCTCTAGAACTAGTACGGCGTGCAAGTAGTGTCTTTCTTTGCACTCCCGCC  
GT  
CCCAGAAGACGCCGCAACAAGCTGAGCTTGCTGGAAGCCGAACAAAGGCGTTACAGAG  
15 CA  
CAAACATAGTGGCAGTGTAGGAACTCTAACTGGGACCAAACTACGGGCCCGGCAGAA  
AC  
GTTCCCCGCCCGAAGCGAAGGCGAACGTCGAAAAGCAAGACCGGGACCGCTCGTCC  
CAG  
20 GATTAGCCACGAAGTTCAGACCAAGTATAGGAGTAAACGCTCGCTCGTCAAACAATT  
G  
TCACCAATCAGCACCACATCGGCACATAACAACCGGTTGCGGAACTCGCATGTGAACAA  
C  
AAGCGGCTCCGGGGGAGTGATCGGCTCGGGCGGATGACCCGGACTCTTCCGCGCAGC  
25 AAC  
TCGGCGTGTTGTTGACGGCAGTACTCCGTAGTTGCCATGACTVACAGTCAATGGCGTGC  
TT  
CACAAGGTGGAGAGCCGAGAAAGCACCTCGGCATGTACGAGTATGTAGATAGTGTATC  
AA  
30 GCAGGAAGATGGGGGTTACTTTATCTCAATCAGATGCCTGTAAGCGAGAGCCGAGAGC  
CT  
GCCCTGTTGTTGACACAATTCTGGCCTGATACGAGTGACAAGCGCTGGGACGGCGGCT  
GG  
GGTCTTTTGCTCGCGGCTTCAGCTCAATCCAATCCTGGGCCGGTGCCGAACGGCCCA  
35 AT  
CGCGAGCGCCACGAAATCGGAGGTCGAGGAAAGAAGGCTGGGCGAGACGCGGCGA  
CAAG

CTGTGGCAAATGGCCAATTGAGGTTCTGGGTCCGGCTGGTGATCAACCATGCATTTCCC  
A  
GCCCCGAGATTCTCTTTCTCTCTCGTGCAGCAGCGGCACCAGCAGCAGCAGCAGCCAG  
GG  
5 GTTTGACCAACCTCTCCGCCAGCCACCGATAGTAAAGATGCTGCCTGCGTATTCTGGG  
C  
TGCAGGAGTTCCAAGATCTTTCGGTCTGGCCACCAGCTGTCACGTCAACCTCCACCTTT  
G  
GACGACGTTGCTGGAAAATTGAAGCCTTCACTAAGATAACTATGCCGTAGCACTTGCA  
10 G  
CCCCGGAAGCTGCAAGTTGATTCTTGGAGGGCTCTCTCCACCACCAATACGGGAGATC  
TG  
GCCCCGCACTTGAGGAGGCTGGAGTCTCGGATCGCCACTTCGCGTCGCCCTGGGCC  
CTG  
15 GGCCCTGGGGTGATGGGCCCGTTGCCGTGGTGGATGGCAGGAGCTTTTCAGCTCTCAA  
TG  
GGCGAATGCTACTCCGTAGGTCGGAGTGGCTGGAAGCGGCGGAACGGACAGGGGGAG  
GTT  
GGGGAAAATGCTCCGCAGGAAGAGCAGGGAGTGGGGAGCTGCGGTCCGGCCCTGTGGA  
20 GCC  
CGTGCAGGGCCAGCTAATCCAATTCGGGCCACAATAAACAAGAGAGGGCCCCACATCA  
TG  
TAAACAGAGGCTCAGAAGCTCCTGCCACACTGGGAGGGTTTCGAAGTCTGACGACTGC  
CA  
25 ATGGACCCCAGCCATCGCGAGCACACAGCAGTTCGCACGCTCCCATTGGGTTCCTCAT  
CA  
CGCAGTCGCTCTCCCCGCCAACCAGCGCCAGGTCCGGGAACAGCGGCGCAAATGCGT  
ATT  
TGAGGGCGCCTCGCTCGAGCAACCTGTGCCTGACCTTCTCCTCCTCCTTCTGCACCTTG  
30 C  
ATCTCGTCGCGTCCACTCGCAGGCAACCACACATCCTCCTCCTCTCCCAAACCCCCC  
G  
CTTTTTCTTTCCCTTGTTGGAATTCGATTGAAAAAGAAGACGGGTCCGTCTAGAGACCGC  
CTTCTCACCTTTCTCTCGACTTCTTTCTAGGAAAAGAAGCAAGAGTCATTCTTCTTGCC  
35 ACCTTCTGGTTCACGGAAGGTCGAGGAGAAGATTGCCTCTGCCCCCAAAGTCGCCAAC  
CT  
GGACTTTGAAGCACGTGTTCCGGTCCCTTTCAGTGTCTTCCCGTCCTCGTACAGGGAGT

C

CGAGACCGCCACCCAAACCCACTCCCACGAAGAGGTTGAGATCAAGCTCCCCAGCTC

GC

CGGACGGGAAGGTCAACACTCTTCATTCCAAGCCCAAGCACATCTTCCTCCCAGCGGA

5 GA

GGGTCGCTTCAGAGAAGAAGAGGTCCGCATCACTCGTCAAGAGGAACATCACCGCCGT

CC

CGGCATCCGTGAAGAGTTCGTTACCCGCGAGGAGCGTCACCCGGTAAGTTTAGTTTTGT

T

10

TTGATTCACCACCCATTGTCTTCCCCGCCTTTTTCTTTTTCTTCCTTGCTCTCTTGCCC

CTGTCTAGTGTAGGGCATTGCCAAGGCCATCTTCACACACACACACCCCCCCCCCCC

CC

ACCCTCAGCTGGGGGGGGGGTGGCCTGGGTTGACCAAGGGACGGTGAAGACTACTA

CTA

15

CTTGAGCCACTCAAACCCATGCATGACACAGGGTTTTCCCTTTTTCTTTCTTTTTCTT

TAACTAACCAACCACTCCAACATTAGCCCTCAGTCAACCTACTCCGAGTCTCGCATCGA

G

TTCGATACTGAGCACCGCACTCACAACCTCCGTCATTGACGTTGCTGAGAGCGAGTATCG

T

20

GCCCGTGTCCAGCCCAACTACCGCAAGGAAGCTTCOGTAGTCGGTACCACCGTCGACG

GA

TCCCGCTTCAGCCACAGCCGCAAGGCCAGCAGCACCACCTCCACCCACACCGACGAGT

AC

ACCGTCGATCCCCCTAGCCACCGCCCCGTCTACAAGAAGGAGTCGGTTGAAGTCGCCG

25

GT

ACCACTGTTGACCCCCCTGCTCCTCGTTTCGACCTACCACGAGCAGGTGAACATTGTTGA

A GAGACCGTTGACGCTCACCGTTACGCTCCTCAACCCAACAACAACACCAATG

Pxy16 (SEQ ID No 28):

GCGGCCGCTTCCCCATGAATGGCAACCGGGCTGATGACCTGTGTGGGAAGAA

30

ATGGGGTT

GGGTCGGGCAATGGGAAGAAAACGGAAAGAGGGGAAGGAAACATGCCTGTAGTCGAGG

CTG

AGAGTGTACGTACGTCCGTACATTCCAGTAACCAGGCGAGAATGAGCAATGATACCCCG

C

35

ATTTCTTGGATAATTAACCTCGTTCCAGAGCACGACTTACGCAGCACTACTCCGTAAGTT

GGAGCGCTTAGCACGCTGGAAACTTGGCAGCCGTCCGAAGCCGCTCGGCCCCATCCT

CTC

GCTGGTAGCTAGTGTAGTCCCGTGCTTTACAACGCGGCTATACAGCCCGTACAGTTGTA  
A  
AGTACCTACATACATGCACTACTATTATTATCCTTCTAGAGTGGGTTCGAATTCCAGGG  
AAGATCTTCCTATGGCTATCTGGCTGAAACTTGGGGGAGGAGTGCGGAAGGGGGGAGG  
5 GG  
AACGAGCCTCCACATTGCATACGACCGGGGAATGCGGGACCCTAAGCGAACCAGGAAC  
CC  
GGTTATTGCACTCGGAATTGCCGCAGATCCCTGCGTTCCACCCGCTCGAACGGTCAAC  
AT  
10 TAACTAATCTGTAGTGGAGTACTGTTGACTTTCTGACTCGTGCTACTGGTCCTCGCCCA  
AGTTCGAAAACAGAATTGCATTTTTGTCTTTTGTTCGGAGCTTTCGAGGAATAATTCCA  
TTGTAGGTATGGAGTAATTATGGAGTATACACGGCCCAGGGGCGCTACACACACCATCG  
C  
CGAGAATGGGAGGTGAGCTCGCGACGCTCAGGATCCCATCGATATTTCCCTTATCCC  
15 T  
GCTCTCACTAGCGCGCAGAGCCGCCTCCGCGCGGGGATGCCGGTTGTTGCCGGCGTG  
CTT  
TTTATCCGCTGCCCTTGGTTGCTCATTTCCTCGGTTCTTGGGTCGCTTGCCAAGCAGCTC  
C  
20 GCGGAGAAGAATACCACAGGAGGGAGCATCGGGGCGCGAAGGGCATTGCACTATGC  
GGA  
CGAGATGCTTCAACACCATCATGGACCTGTCCGGAACCTCCAAGAACAGGCGACGCCA  
AG  
GACGGAGTAGACCTCCCCGGTCCGTCTTCTCTCTGCCTGGCAATTTAGCCAAAATCCG  
25 A  
CCCGACTTGCGACGATTCCCTACCTCCTAGCGCGTGCGCGCTGAAGCAGTCGCGAGAGT  
CG  
CAAGGCATGGGCCCGAGTCTGGCTGGCATCGTCAAACGTGATCGGCCCGTCGAGCGT  
GCG  
30 TGTATAAATGCATCAAGGAGCGACTGCCCCCCATCAATAACCACCCGTTGCTTGAGT  
C  
TCTCGCACTCGCGGCCCTTCTTCTCTGCTTCGCACGCATCTCGCTGTCTCGCTGTCTC  
G  
CTGTCTCACTGTCTCGCTGTCTCACTGTCTCGCTGTCTCACTGTCTCGCTGTCTCACTGT  
35 CTCACTCGTCCATCAGAGCAAAACCATG

Pglal (SEQ ID No 29):

TAGTAGTTGTCAACCTTGGCAGCGAGAGTCCCGAGGCGGTAGATGAGAGAAAA

AAGGACC

GATGTTGACTTCCATGCCATCGATGGCGTCGTCTCGGCTAGACGTCGTGGCGTTATTC  
T

5 GGGGGAGGCAATCCCGGGTGAGGAGAGAAATAGACGCGTCGCCATCTAGCAGCCATC  
ACT

CAGTGGCATCACCTGCGCGTTGACTTGCCTTCGAAGGCTCTCCTGAGCCGAGCATGTG  
AT

TACGATGTATAAGACCTGCATTGAGCTCGACGTTCCCGAGCGTCGGCGCGAGCTTCCA  
AT

10 TCGGTTGAGGCTCCGGCGGCTTCCCCGGTTTCCTGCTGGACTAGCTGCCGTGGCGG  
GGG

GACGGCAGAGCGACTCCGACGCGCCCCATGCGAGCAACGGCCCCGATTTTCGATGAGA  
TCT

15 GCGGGGCGCCGGAGTGGCAGCAGTTCGTGAGCTTGGCAGGCACGGCTCCCCACCTTC  
TTC

CTTCTTCCACACTAGGCCCTCCCACAAGCGACCAGATGCTTGTTAAGTACGCAGTAGTG  
T

CTCGGCTCGCCCAGAGAACAATGGCACGCCGATCTGTCTAATGACCAAGAGCCACGGT  
TC

20 GAGACCATCCATTGGACTGGAGGGCCTGCGAGGCATCACGCCGAACCCATGTCATGCT  
AC

TCTTTCTGTTACCCCCGGAGATGGCGTGAAACTGCGCGTTTACTCGCGGCTCAGCATG  
T

25 GCTCACGTTGGGTAGGTCCCGCAAAGTCAGAGGTAGGGAGGTACTTTGTAGGCACAAA  
TC

ATGTACACGTTTCGTACCTGAGGTAGCTATCTCGCCTCAGGCACACGAGGCCCGTTTCGA  
CG

AGAGAGAGGAAGAGCAACCAAGAATAGTCAAGGATATTACTCTTTCCCTGGTATTTTC  
TGGACATTTTGTCCAGGATTTTGTTCGCCCTTTAATTTTGAACAATTATGCTCCCGTCGG

30 CTCCGATCCACGCCTCTTAAGTCTCCTTTAGCCTTTCGCCTCTATTTCTTGAATTTCAA  
TTCTCCCAAGGGCCCTGCTTTCTACAGCAAAGAATCCGTACCCTACTCTCTTTTCGCGCA

C  
AGAGTGAGGGAGCAACAGGGATTGCGAAATGCACAGCAGAGTTTGTGTAACCTTCGGCA

GC

35 TCTTCCCCACATTCAGATGCATGTTACTGGAGAATGCGGAGAAGTTATAGTCTGGGGTA  
G

TAGGTATAACGCTGGTACTCCCGAGGTAGGTAGCAACCTTGGCTGACCTTGGGAAGCG

AG

GGCGCTTGTGACGCTGACGATCCAGAAGCAGCCCCGCGATAGTATACGTGGAGACGGT  
GCTTCTTGCTATAAGCGCTCAACTCCGCTACCCATGTTCCACCGTCTTCCCCTTGGACGACG  
5 GCATCACTCCGATACCCATGTCTCCTGGGTAGCTCCGAGTAGTCGCCCGAGCGCCCTTC  
TCCCCCCTCCCCCTTTCTCCTAATAAACGGCCGAGTCGGGCAGCCTCGACGTTGCACCGT  
AG10 CGTCGCAGCCTGCGTAGAAGCACGCGTAGAAGCACCGAGCTCCAAGCTCCAAGACGC  
CAAAAGCCGCCGCGAAGTGGCCGTCGGCCCTTCCCCGCATGCGCAGCTCCGGCACCAGGT  
CCGAAACGCTCCATCACCCCATATCCCAGTCAGAACAGCGGCTGCTTCCGGATTTGGAAGT  
15 CTGGAGGTCGCGAATGAAGGCTCGCGTTCGACTATAATAACAGCTCCGGATGGCAGGCC  
TCGTTGCCAGCTCCAGGACCACCTCCCATCCGTAAACGGATCTGGCCTCGTCACGCCCG  
CCATG

20 Sequência de Alpl DNA compreende (SEQ ID No 30):

ATGCACTTCTCCACCGCTCTCCTGGCCTTCTGCCCGCCGCCCTCGCGGCCCTACTG  
CCGAGACCCTCGACAAGCGCGCCCCGATCCTGACTGCTCGCGCTGGCCAGGTCGTCCCGGGCAAGTACATC  
ATCAAGCTCCGCGAC25 GGAGCCAGCGACGATGTCTTGAGGCCGCCATCGGCAAGCTCCGCTCCAAGGCCGAC  
CACGTCTACCGCGGCAAGTTCAGGGGCTTTGCCGGCAAGCTCGAGGATGACGTCTTGACGCCATCCGTCTTC  
TCCCCGAAGtgagt

ccgcgtcccggaaagaaatagagcgagcgggggagagagtgaagggcgaaaagagccgtgtttgttaaccg

30 ctigtcttttctctctcttgcaatagGTCGAGTACGTGAGGAGGAGGCCATCTTACCATCAACGCG  
TACACCTCGCAGTCCAACGCCCCCTGGGGCCTTGCGCGCCTCTCGTCCAAGACCGCGGG  
CTCCACCACCTACAC

CTACGACACCAGCGCCGGCGAGGGCACCTGTGCCTATGTGATCGACACGGGCATCTAC

35 ACTAGCCACTCCgt

atgtctcgggttacctccccttcggaagaaggggcatccatgctgaccctcctgatcacagGACTTC

GGCGGCCGTGCCACTTTCGCCGCCAACTTCGTGACAGCTCTAACACCGATGGCAACG

GCCACGGCACCCAC  
 GTCGCCGGCACCATCGGCCGGCACCACGTACGGTGTGGCCAAGAAGACCAAGCTCTACG  
 CCGTCAAGGTTCTC  
 GGCTCCGACGGCTCTGGCACCACgtaigcctcgcacccgcaccccgcacaccccggccggtatctct  
 5 gactgacattcctcttctcctctctagTTCTGGTGTCAATTGCTGGCATCAACTTCGTCGCTGACGACGC  
 GC  
 CCAAGCGCAGCTGCCCAAGGGCGTCGTCGCCAACATGTCGCTCGGCCGGTAGCTACT  
 CGGCCTCCATCAACA  
 ACGCCGCCGCCCTCGTCAGGTCGGGCGTCTTCTGGCCGTCGCCGCCGGCAACG  
 10 AGAACCAGAACGCCG  
 CCAACTCGTCGCCCGCCTCCGAGGGCGTCCGCCTGCACCGTCGGCGCCACCGACAGGA  
 ACGACGCCAAGGCCA  
 GCTACTCCAACACTACGGCAGCGTCGTCGATATCCAGGCCCCCGGCTCCAACATCCTGAG  
 CACCTGGATCGGCA  
 15 GCACCTCTGCTACCgtaagccccccctccccccacccaccccagccttggcgacattcccggcccgatt  
 tatttctccgggggtgggggagaaacaaaacaaaatagcgaacalagagatgcactctcagAACACCATCTCGG  
 GTACCTCGATGGCCTCCCCCACATTGCCGGCCTCGGTGCCTACCTCCTGGCCCTCGA  
 GGGCTCCAAGACCC  
 CTGCCGAGCTCTGCAACTACATCAAGTCGACCGGCAACGCCGCCATCACTGGCGTTCC  
 20 CAGCGGCACCACCA ACCGCATCGCCTTCAACGGCAACCCCTCTGCCgta

Sequência de aminoácido Aipl (SEQ ID No 31):

1 MHFSTALLAF LPAALAPTA ETLDKRAPIL TARAGQVVPG KYIIKLRDGA  
 SDDVLEAAIG  
 61 KLRSKADHVV RGKFRGFAGK LEDDVLDAIR LLPEVEYVEE EAIFTINAYT  
 25 SQSNAPWGLA  
 121 RLSSKTAGST TYTYDTSAGE GTCAYVIDTG IYTSHSDFGG RATFAANFVD  
 SSNTDGNGHG  
 181 THVAGTIGGT TYGVAKTKL YAVKVLGSDG SGTTSQVIAG INFVADDAPK  
 RSCPkgVVAN  
 30 241 MSLGGSYSAS INNAAAALVR SGVFLAVAAG NENQNAANSS PASEASACTV  
 GATDRNDAKA  
 301 SYSNYGSVVD IQAPGSNLS TWIGSTSATN TISGTSMASP HIAGLGAYLL  
 ALEGSKTPAE  
 361 LCNYIKSTGN AAITGVPSGT TNRIAFNGNP SA

35 Lista de referências

Braaksma, M. and P. J. Punt. 2008. Aspergillus as a cell factory for protein production: controlling protease activity in fungal production, p. 441-455. In G. H. Goldman and S.

A. Osmani (ed.), *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, CRC Press, Boca Raton.

Verdoes, J. C., Punt, P.J. , Burlingame, R., Bartels, J., van Dijk, R., Slump, E., Meens, M., Joosten, R. and Emalfarb, M., 2007. A dedicated vector for efficient library construction and high throughput screening in the hyphal fungus *Chrysosporium lucknowense*. *Industrial Biotechnology* 3, 48-57.

## REIVINDICAÇÕES

1. Cepa de fungo hospedeiro de *Chrysosporium lucknowense*, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a secreção endógena de celulase é menos do que 20% da secreção de celulase endógena de *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25.
- 5           2. Cepa de fungo hospedeiro, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a secreção de um ou mais grupo que consiste de protease endógena,  $\beta$ -glucanase endógena e celobiohidrolase endógena é menos do que 20 % da secreção de protease endógena,  $\beta$ -glucanase endógena e celobiohidrolase endógena respectivamente de *Chrysosporium lucknowense* cepa UV 18-25.
- 10           3. Cepa, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** adicionalmente pelo fato de que a secreção de celobiohidrolase endógena 1 (Cbhl) está ausente.
4. Cepa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que é W1L depositada no CBS sob o número de acesso 122189 de ou W1L#100.1 depositado na CBS sob o número de acesso 122190.
- 15           5. Cepa, de qualquer com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, adicionalmente **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o gene que codifica endoquitinase 1 (*chi1*) foi interrompido.
6. Cepa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CHARACTERIZADA** adicionalmente pelo fato de que um ou mais genes selecionados do grupo que consiste des-
- 20           tes que codificam protease 1 alcalina 1 (*alp 1*), protease 2 alcalina (*alp2*), proteinase A (*pep4*),  $\beta$ -glicoamilase (*Gla1*), exo-quitinase (*Chi2*) e laminarinase (*Lam1*) foram interrompidos.
7. Cepa, de acordo com a reivindicação 6, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que é W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ pyr5 ou W1L#100.1 $\Delta$ alp1 $\Delta$ chil $\Delta$ pyr5.
- 25           8. Método para produção de homólogos e/ou heterólogos de uma proteína pura, com uma pureza superior a 75%, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende expressar um gene que codifica dita proteína na cepa conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.
9. Método para a produção de misturas de proteínas artificiais, **CHARACTERIZADO**
- 30           pelo fato de compreender a expressão de genes que codificam cada uma de ditas proteínas da mistura em uma cepa conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.
10. Método para triagem simplificada de cepas, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que funcionalmente expressam uma enzima desejada pela aplicação de cepas, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.
- 35           11. Sequência de promotor isolado apropriado para o controle transcricional da expressão de gene em *Chrysosporium lucknowense*, **CHARACTERIZADO** pelo fato de ser selecionada do grupo que consiste em:

o promotor *chi 1*(0.8) compreendendo a sequência de nucleotídeos SEQ ID NO 25,  
o promotor *chi 1*(1.8), **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender a sequência de  
nucleotídeos de SEQ ID NO 26,

5 o promotor *hex1* compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 27,  
o promotor *xy16* compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 28,  
o promotor *gla* compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO 29  
ou uma parte transcricionalmente ativa do mesmo.

12. Gene quimérico, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a sequência de  
promotor conforme definida na reivindicação 11.

10 13. Célula hospedeira, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender a sequência  
promotora isolada conforme definida na reivindicação 1 ou o gene quimérico conforme defi-  
nido na reivindicação 12.

15 14. Método para isolar uma cepa de fungos hospedeiros de *Chrysosporium luckno-  
wense* **CARACTERIZADO** pelo fato de que a secreção de celulase e de protease é menos  
do que 20% da secreção de celulase e protease respectivamente de *Chrysosporium  
lucknowense* cepa UV 18-25, compreendendo as etapas de

(i) plaquear *Chrysosporium lucknowense* em placas de celulose inchadas com áci-  
do (ASC), (ii) selecionar pelo menos uma colônia mostrando uma zona de clareamento de  
celulose reduzida,

20 (iii) plaquear a cepa selecionada na etapa (ii) em placas de leite desnatado, e

(iv) selecionar pelo menos uma colônia mostrando um halo de degradação de pro-  
teína reduzido.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de  
compreender adicionalmente as etapas de mutagênese antes das etapas (i) e/ou (iii).

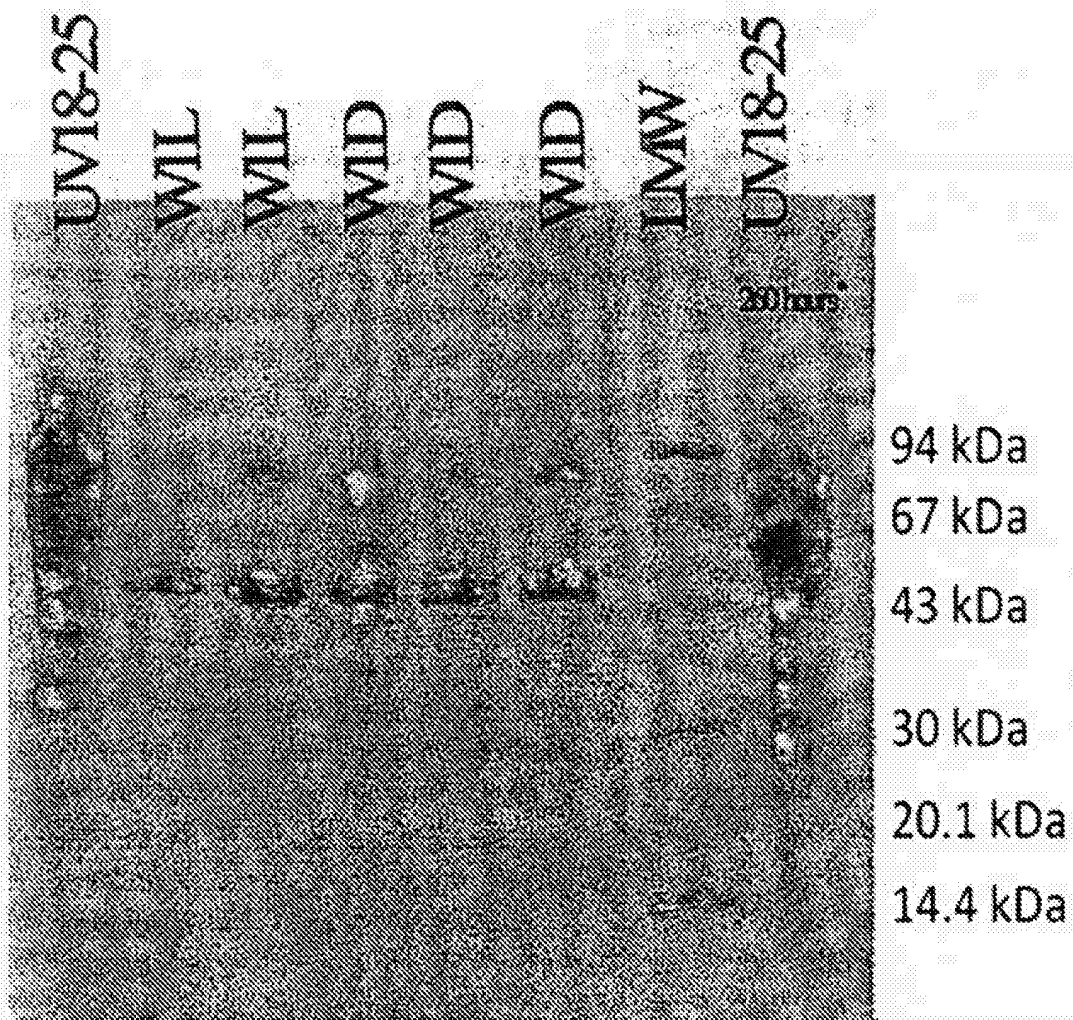


Fig. 1

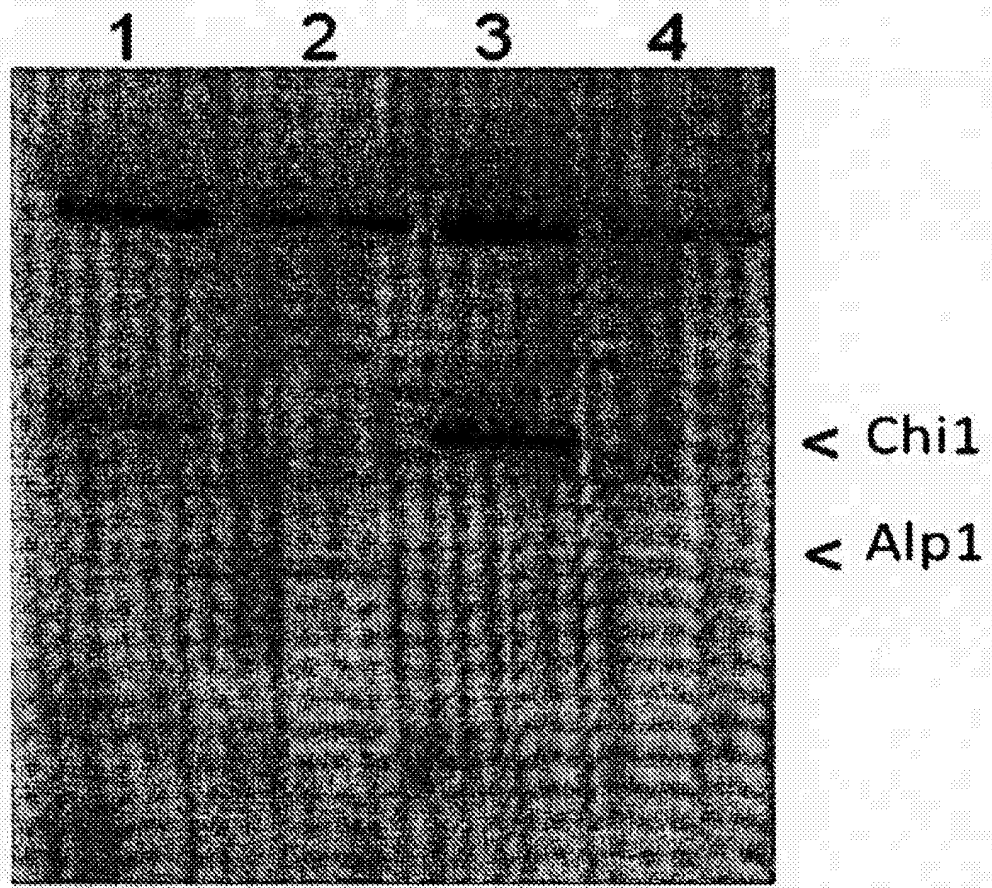


Fig. 2

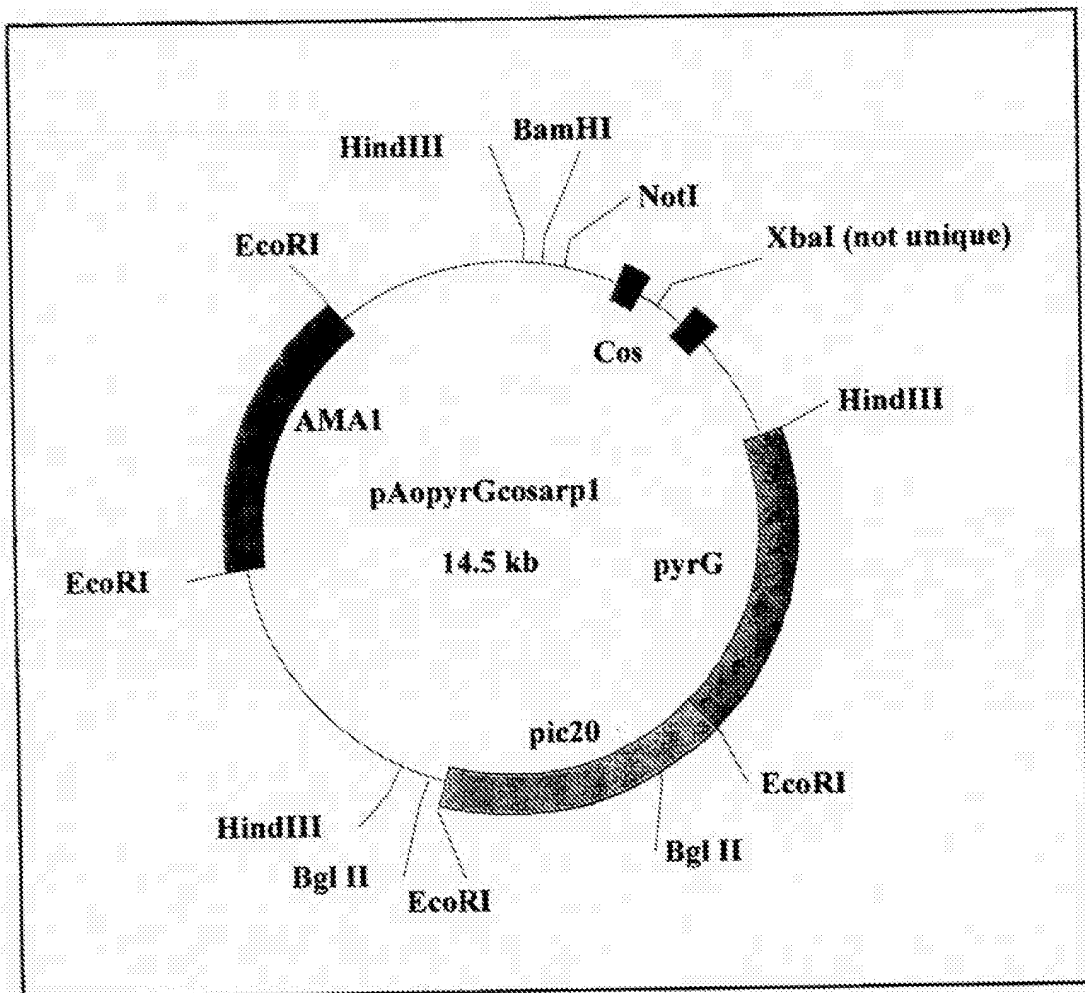


Fig. 3

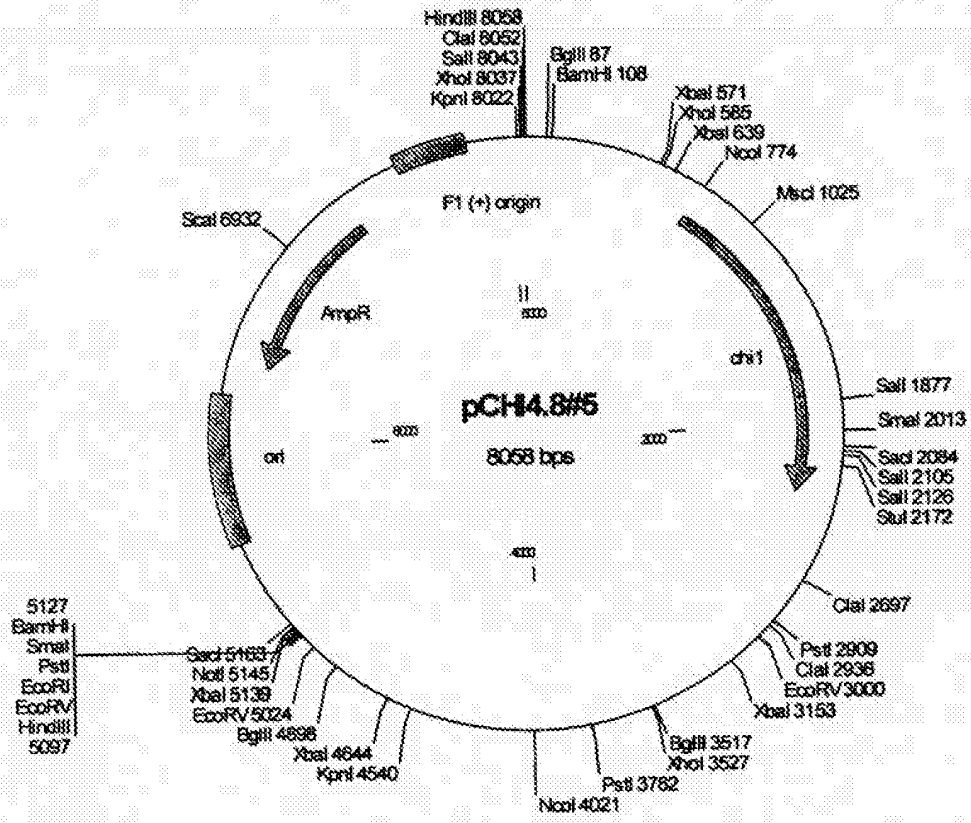


Fig. 4

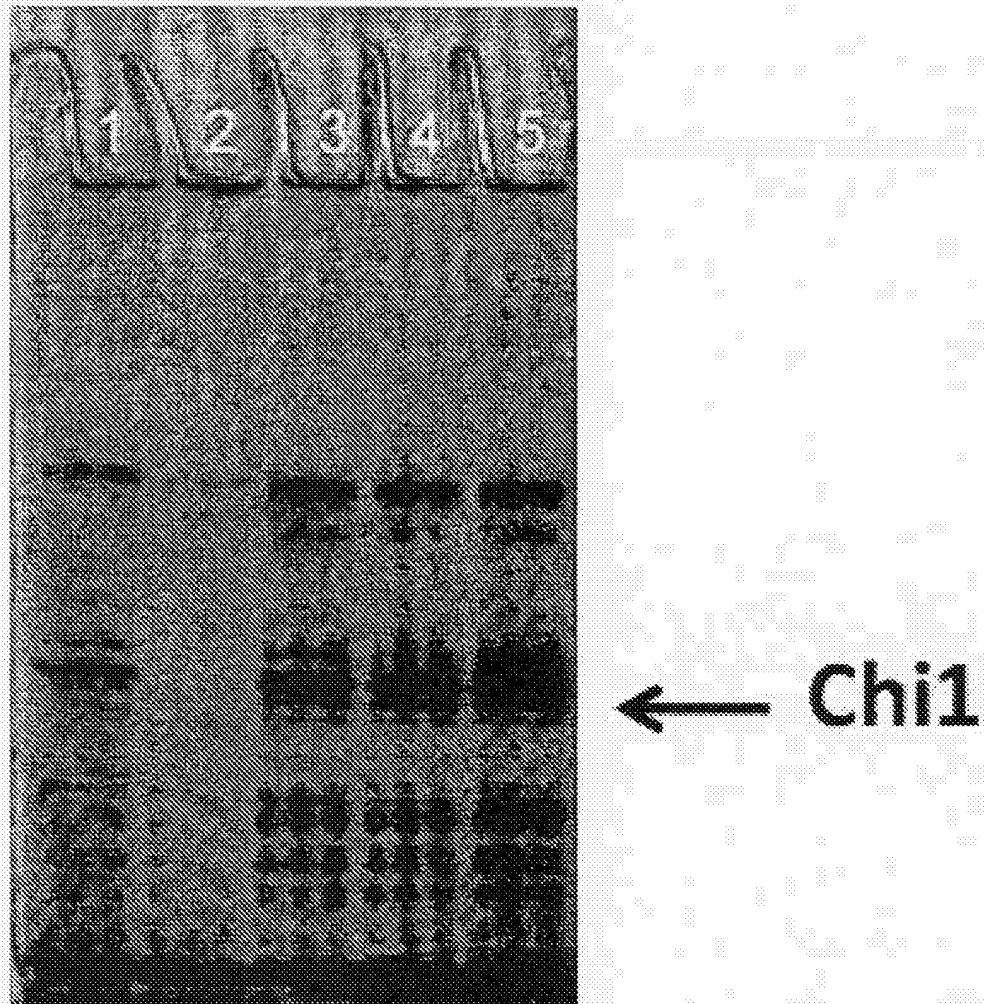


Fig. 5

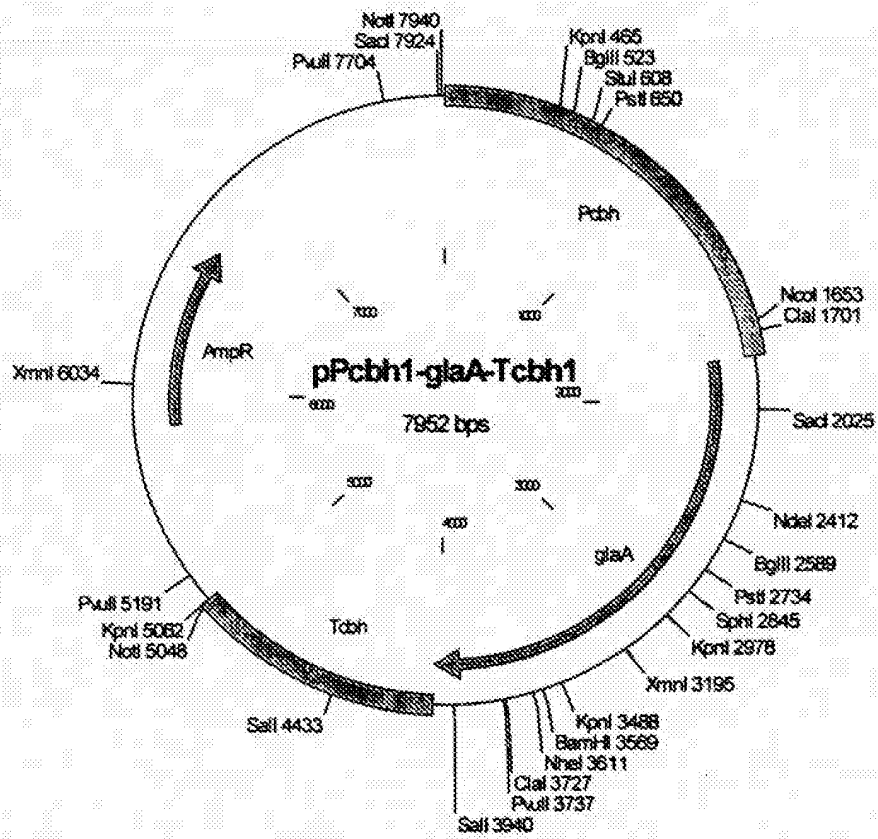


Fig. 6

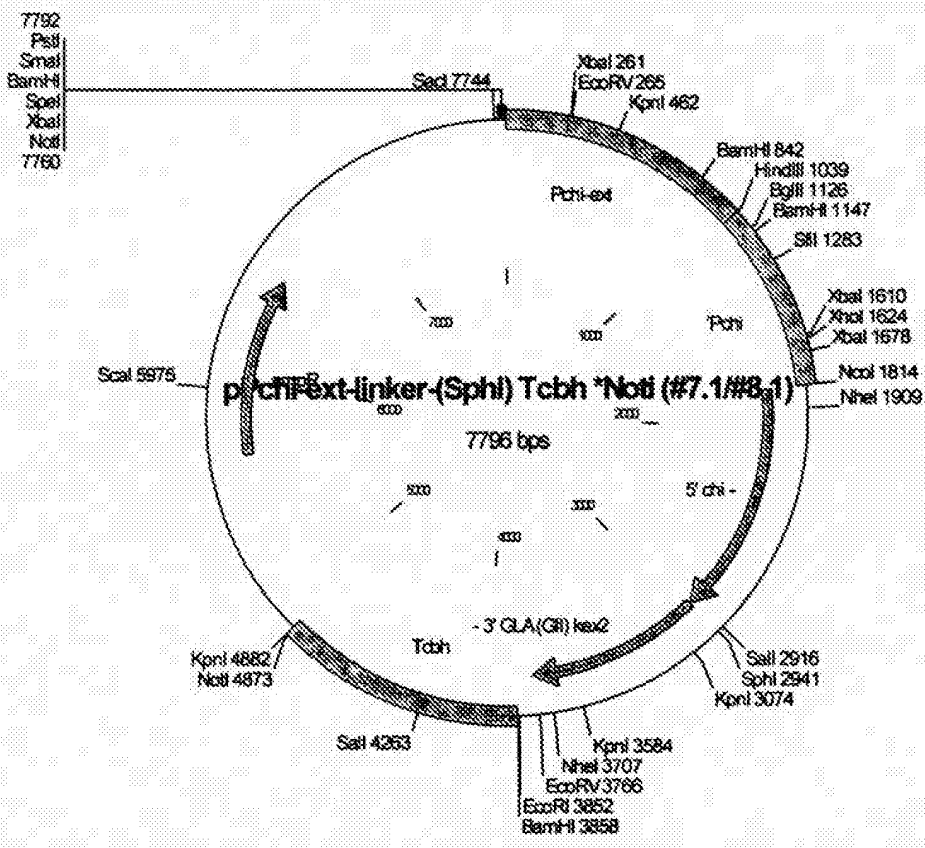


Fig. 7

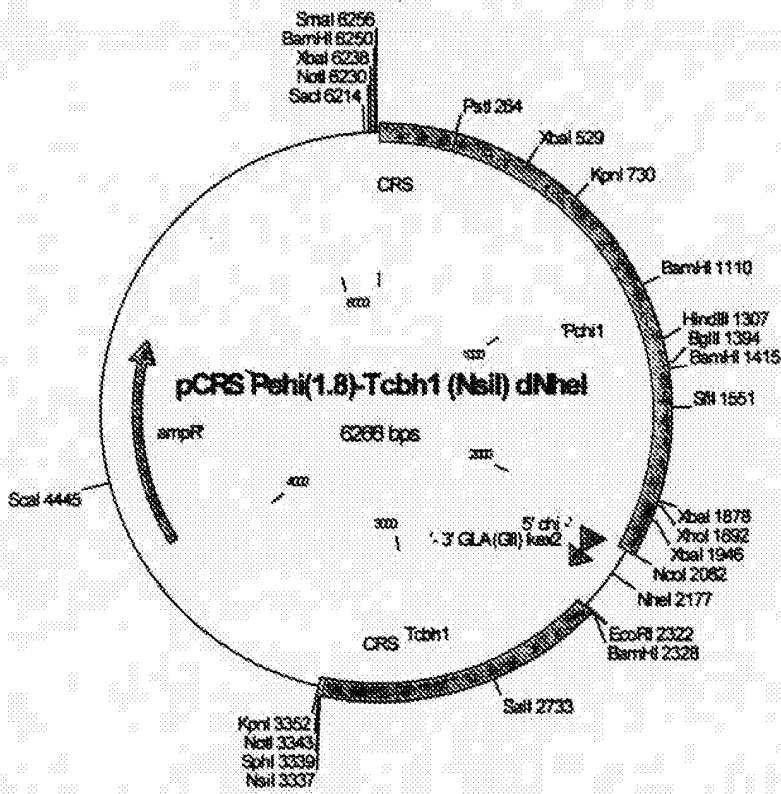


Fig. 8

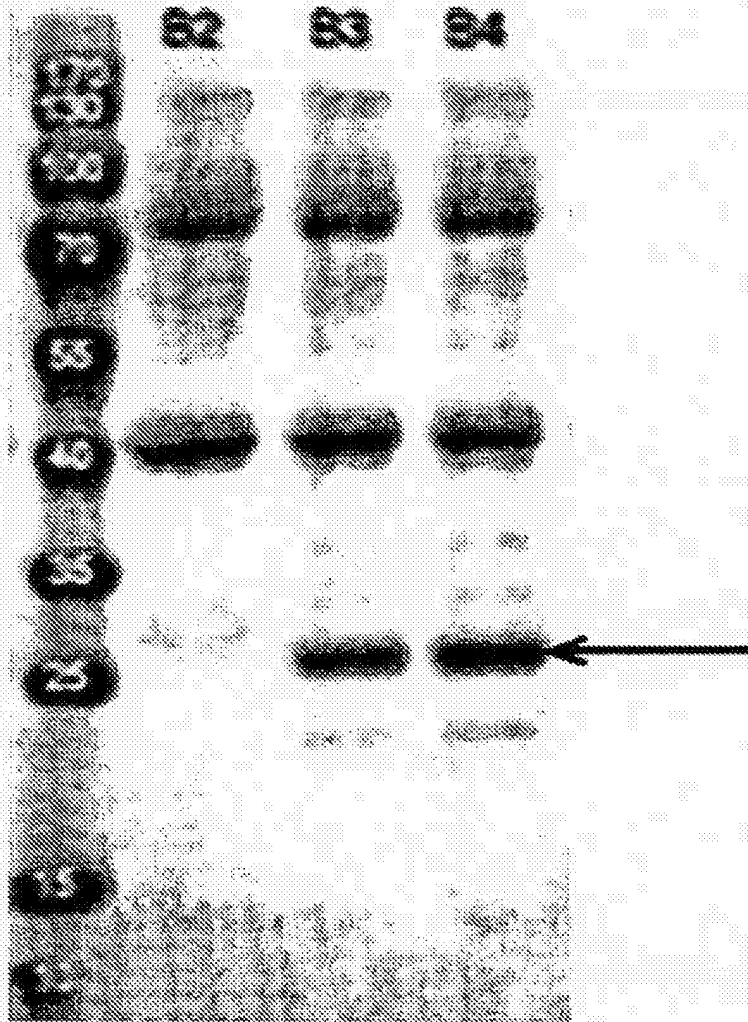


Fig. 9

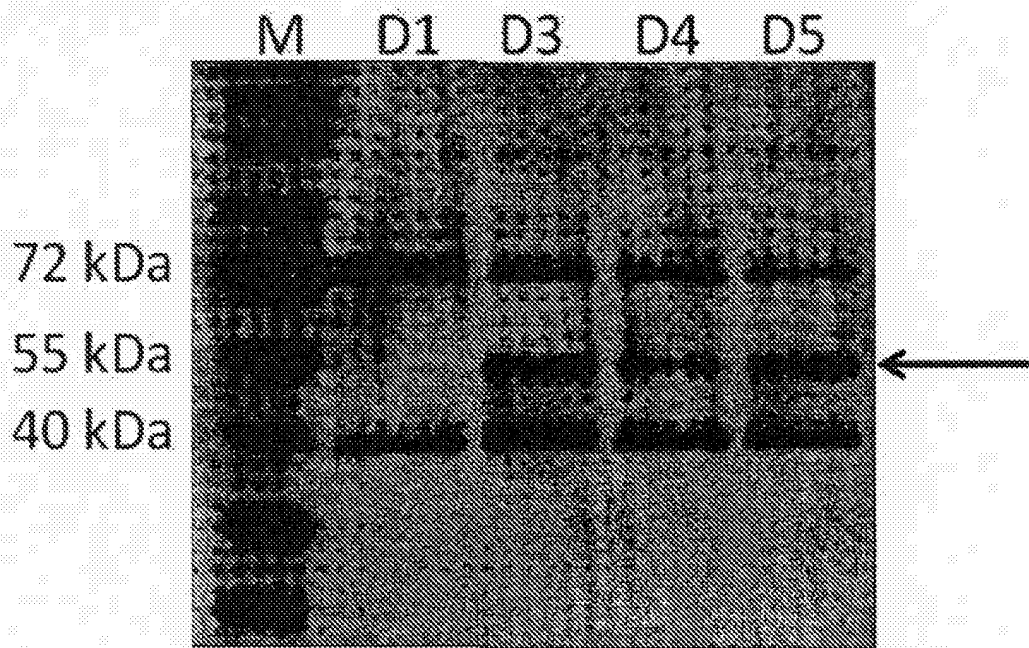


Fig. 10

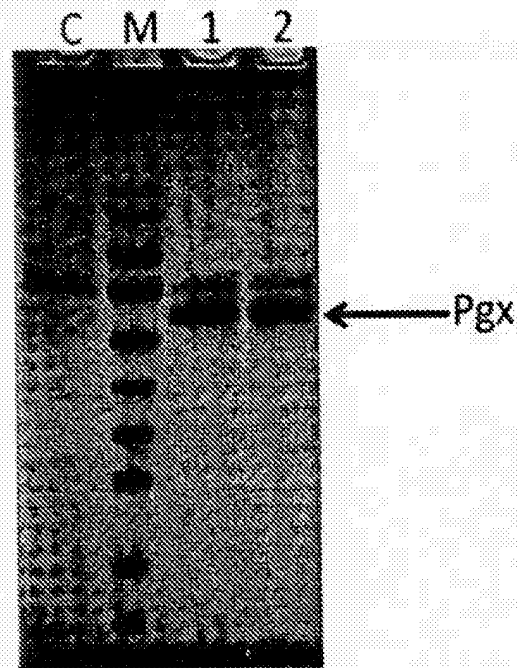


Fig. 11

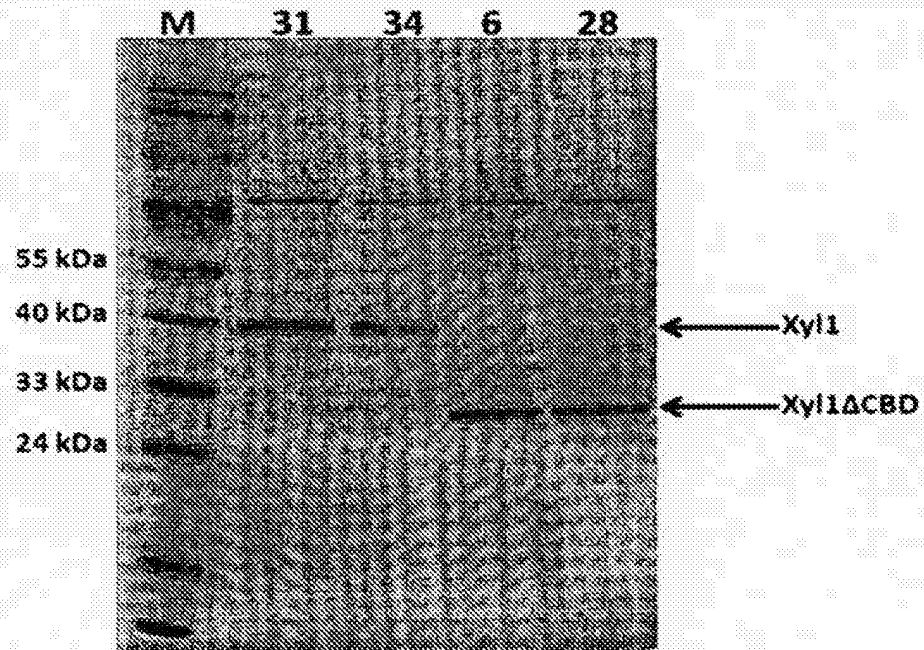


Fig. 12

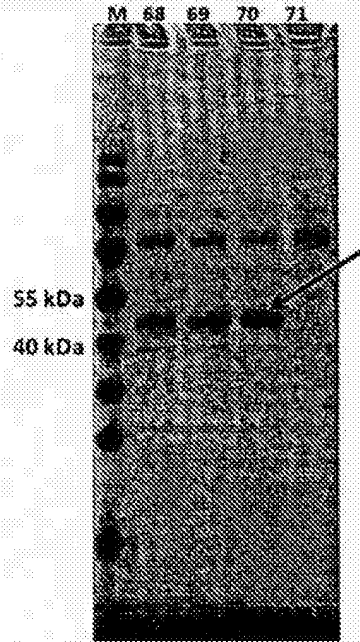


Fig. 13

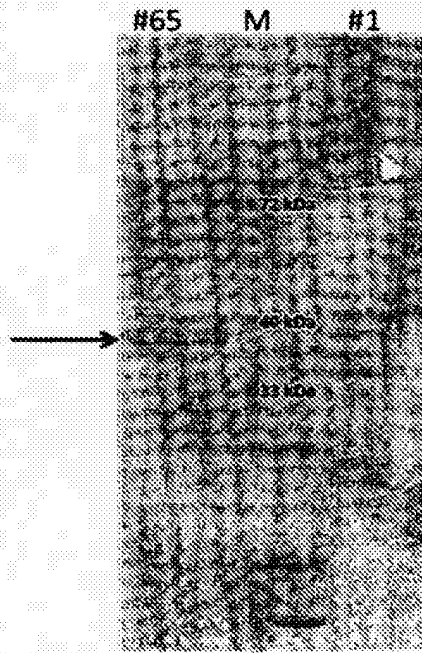


Fig. 14

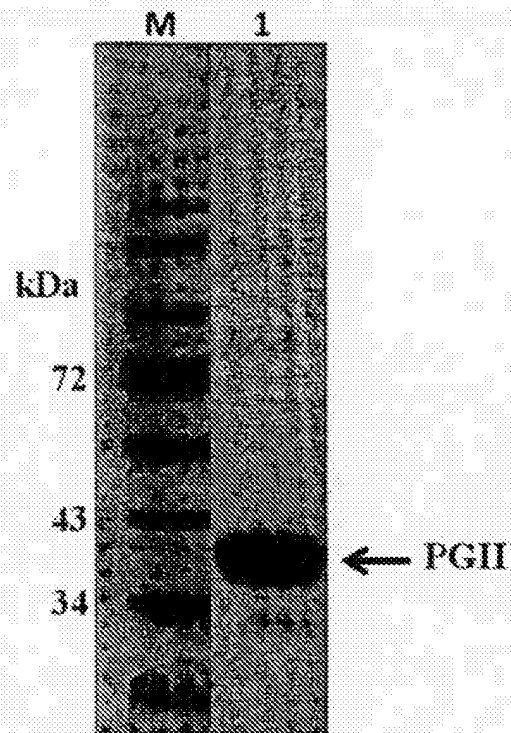


Fig.15

## RESUMO

### “SISTEMA DE PRODUÇÃO DE FUNGOS”

A presente invenção fornece um novo sistema de produção de fungos que compreende uma cepa de fungos hospedeiros de *Chrysosporium lucknowense* onde a secreção endógena de celulase é inferior a 20% da secreção endógena de celulase de *Chrysosporium lucknowense* cepa 18-25 UV. Preferencialmente, ainda a secreção de protease endógena,  $\beta$ -glucanase endógena e celobiohidrolase endógena é inferior a 20% da secreção de *Chrysosporium lucknowense* cepa 18-25 UV. Além disso, cepas fúngicas hospedeiras são fornecidas onde vários genes foram interrompidos. De acordo com outro aspecto da invenção um método para produção homóloga e/ou heteróloga de uma proteína pura com uma pureza superior a 75%, que compreende expressar um gene que codifica dita proteína em uma cepa de acordo com a invenção foi descrito. Além disso, um método para a produção de misturas de proteínas artificiais compreendendo a expressão de genes que codificam cada uma de ditas proteínas em uma cepa de acordo com a invenção foi revelado. Finalmente, um método para triagem simplificada de cepas que funcionalmente expressam uma enzima desejada pela aplicação de ditas cepas foi fornecido.