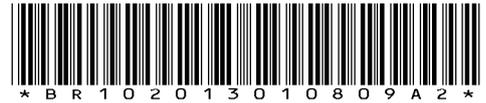




República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **BR 10 2013 010809-0 A2**



(22) **Data de Depósito:** 02/05/2013

(43) **Data da Publicação:** 30/06/2015
(RPI 2321)

(54) **Título:** OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, SEQUÊNCIAS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ENDOGLUCANASE E USOS DA ENDOGLUCANASE

(51) **Int.Cl.:** C12N15/56; C12N9/42; C12R1/885; C12R1/685; A23K1/00; A23L1/00; D06M16/00; C11D3/386

(73) **Titular(es):** Universidade de São Paulo - USP

(72) **Inventor(es):** Igor Polikarpov, Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini, Viviane Isabel Serpa

(57) **Resumo:** OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, SEQUÊNCIAS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ENDOGLUCANASE E USOS DA ENDOGLUCANASE. A invenção descreve oligonucleotídeos para produção de endoglucanase, sequências para produção de endoglucanase, processo de obtenção de endoglucanase e usos da endoglucanase. A enzima hidrolítica recombinante endoglucanase tem pH ótimo próximo de 2, possuindo grande potencial para ser utilizada em processos biotecnológicos e/ou agroindustriais que envolvem hidrólise de celulose, carboidratos e glicosídeos e utilizam pHs ácidos, tais como na indústria têxtil, indústria de papel e celulose, ração animal, indústria farmacêutica e agroindustrial, especialmente em condições que necessitam utilização de pH na faixa de 0,5 a 4.

**OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE,
SEQUÊNCIAS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, PROCESSO DE
OBTENÇÃO DE ENDOGLUCANASE E USOS DA ENDOGLUCANASE**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A invenção se insere primariamente na área da
Biotecnologia, mas de forma mais específica tem aplicação
nas mais diversas áreas, tais como: fabricação de ração
animal, processos da indústria alimentícia incluindo a
fabricação de alimentos para humanos, processos na
10 indústria têxtil, processos na indústria química, processos
de extração de chás, processos de fabricação de proteína de
soja, processos de fabricação de óleos essenciais,
processos de fabricação de aromatizantes, processos de
produção de detergentes, processos de produção de polpa de
15 celulose, processos de produção de papel, processos de
tratamento de resíduos, processo de fermentação e produção
de bioetanol, e processos de produção de biocombustíveis
líquidos.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

20 As celulasas são enzimas que constituem um complexo
capaz de atuar sobre materiais celulósicos, carboidratos ou
glicosídeos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas
começaram a ser estudadas com maior intensidade durante a
Segunda Guerra Mundial quando militares preocupados com
25 excessivo desgaste de roupas e equipamentos nas selvas do
Pacífico Sul, recolheram amostras de microrganismos
suspeitos de serem os responsáveis pelo prejuízo e as
levaram ao laboratório de pesquisas do exército. O grupo de
pesquisadores, liderado pelo Dr. Elwyn T. Reese, passou a
30 conduzir seus experimentos no laboratório das forças

armadas, em Natick, Massachusetts, Estados Unidos. Entre milhares de amostras recolhidas, uma de Nova Guiné, mostrou conter um fungo - *Thichoderma viride* (atualmente denominado *T. reesei*, em homenagem ao seu descobridor, Elwyn Reese) -
5 capaz de converter celulose em seus monômeros. (BJERRE; SCHMIDT, 2007 e FENGEL; WEGENER, 1989).

As celulasas possuem uma ampla faixa de aplicações, tendo seu uso intensificado nos primeiros anos da década de 80, primeiramente na indústria de ração animal, e
10 posteriormente na indústria alimentícia, têxtil e lavanderia (BHAT, 2000). Essas enzimas também podem ser utilizadas em vários processos tais como: extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes, no mercado de detergentes, na indústria de polpa, de papel,
15 no tratamento de resíduos, fermentação e na produção de bioetanol em usinas com destilaria em anexo (KIELING, 2002; RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004; ZHANG, et.al 2006).

Em relação à produção de celulasas relacionada com ração animal, pode-se dizer que sua aplicação como um
20 aditivo de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos, começou em meados da década de 80. As enzimas na alimentação animal têm sido utilizadas para suplementar dietas à base de cereais ricos em polissacarídeos não amiláceos os quais provocam distúrbios
25 intestinais. Além disso, o fato dos animais monogástricos apresentarem incapacidade de digerir celulose e hemicelulose, proveniente do déficit da produção de enzimas como as amilases e proteases, e a ausência de outras como as celulasas, limita o valor econômico e nutricional de
30 cereais (REIS et al., 2001). Dessa forma, a melhoria na

digestibilidade dos alimentos obtida através da incorporação de enzimas nas dietas permite alterar as formulações dos alimentos minimizando custos.

5 Ao adicionar enzimas na ração animal, pretende-se diminuir os fatores anti-nutricionais dos alimentos e aumentar a disponibilidade de nutrientes, além de diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes como, por exemplo, o fósforo (GUENTER, 2004).

10 Sabe-se que EM nível estomacal, onde o pH varia de 2,0-3,5, ocorre uma fermentação limitada de açúcares, amido e algumas hemiceluloses, como resultado da atividade fermentativa bacteriana reduzida, a qual é inativada pela queda do pH por ação do suco gástrico (LONGLAND, 1991). Um estudo desenvolvido por SMIRICKY *et al.* (2002) sugere que a
15 não melhora nas dietas suplementadas com uma alfa-galactosidase se deve ao fato da enzima ter um pH ótimo de 5 e temperatura ótima de 60 °C, o que acarreta a inativação da enzima quando esta alcança o estômago, uma vez que estes valores não são representativos das condições
20 gastrointestinais de suínos.

Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, porém auxiliam o processo digestivo melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta. De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações
25 animais podem ser enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais (proteases, amilases, fitases) ou então, enzimas que esses animais não podem sintetizar e, ou sintetizam em pequenas proporções (β -glucanases, pentosanas, e α -galactosidases) (CAMPESTRINI *et al.*, 2005). Qualquer que seja
30

a finalidade da enzima para suplementar dietas para monogástricos, elas devem possuir características bioquímicas específicas relacionadas com a sua estabilidade e atividade, que possibilitem maximizar sua eficiência, tais como temperatura de atuação, pouca sensibilidade ao repertório proteolítico endógeno, e uma eficiência ótima para valores de pH compreendidos entre 2 e 5, sendo resistentes à desnaturação ácida, características encontradas na enzima em questão.

10 Outra aplicação das celulasas se refere à indústria têxtil, na qual a principal fibra utilizada é o algodão, constituído por celulose e outras fibras contendo celulose nativa e/ou modificada e por isso, as oportunidades de aplicação das celulasas nesta indústria são numerosas. A
15 maioria dos tratamentos enzimáticos aplicados às fibras celulósicas tem como finalidade a substituição de produtos químicos usados nos processos tradicionais bem como obtenção de novos efeitos de acabamento, criar uma superfície mais lisa, aumentar o brilho, evitar a formação
20 de peloteamento (*pilling*), remoção do excesso de corantes em tecidos *jeans* danificando menos as fibras do tecido do que as pedra-pomes utilizadas neste processo (MUSSATTO et al., 2007). Estudos recentes usam celulasas também para a remoção do material celulósico em tecidos de fibras mistas
25 (poliéster/algodão) para produzir tecidos mais finos.

Um dos grandes desafios da aplicação das celulasas na indústria têxtil e lavanderias é o uso de formulações corretas para a utilização das enzimas (BHI, 2000).

As celulasas, por exemplo, preferencialmente ácida e
30 com elevada atividade endoglucanásica, devem ser utilizadas

para remoção do excesso de microfibras da superfície do algodão, pois não danificam o tecido, características da Endoglucanase aqui descrita. Existem diferentes parâmetros que influenciam a habilidade das celulases atuarem na
5 celulose do algodão. As condições ótimas de tratamento com celulases comerciais provenientes do fungo *T. reesei* são 50 °C e pH 5 e a atividade enzimática diminui rapidamente acima de 65 °C de ambos os lados do pH ótimo. No caso da endoglucanase aqui descrita, a acidez empregada no processo
10 pode ser bem mais elevada, podendo chegar na faixa de pHs entre 0,5 a 2, o que pode ser extremamente útil para esta aplicação.

Atrelado ao mercado têxtil, celulases também fazem parte de formulações de detergentes domésticos aumentando
15 efeito de detergência (BHAT, 2000; CAVACO-PAULO, 1998). São incluídas em muitos detergentes em pó, para remover extremidades de microfibrilas que são retiradas do tecido juntamente com a sujeira e, ainda, proporcionam maior brilho aos tecidos.

20 Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos para aumentar o rendimento da extração de amido, a extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de
25 laranja e do ágar (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004). Em combinação com pectinases têm contribuído para uma melhor extração e clarificação de sucos (BHAT, 2000) e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (ORBERG 1981).

30 Outra grande aplicação das celulases é no processo de fabricação da polpa de celulose, onde é realizado o refino

da mesma, sendo removidos materiais lenhosos que prejudicam a qualidade da polpa, permitindo o enxágue das fibras e aumentando a velocidade da fabricação do papel (BHAT, 2000). Auxiliam também no bio-branqueamento da polpa na indústria e na reciclagem dos resíduos do papel (GÜBITZ et al., 1998; BAJPAI, 1999). A fabricação de papel reciclado é possível, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação das folhas de papel (PELACH et al., 2003).

A última aplicação aqui citada, e a mais atual, é o uso das celulasas voltado para a produção de biocombustíveis líquidos utilizando a biomassa lignocelulósica. Devido à dificuldade de degradação de celulose em condições ambientais, resíduos celulósicos se acumulam o que os torna um transtorno para o meio ambiente. A partir da hidrólise total da celulose, obtém-se somente glicose, que pode ser biologicamente convertida em bioetanol, o qual além da utilização como combustível veicular ou aditivo de combustível; empregado na produção de moléculas como butadieno, ésteres e etileno; aplicado na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (SCHLITTLER et al., 2008).

A bioconversão de celulose em açúcares fermentáveis é uma tarefa que tem consumido um enorme esforço científico e é de fundamental importância para a produção de bioenergia. O grande desafio é tornar esses açúcares disponíveis para a fermentação alcoólica de maneira economicamente viável. Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a

atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, concentração, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulasas (SUN & CHENG, 2002). O uso de celulasas tem como entrave, o custo de produção, o qual pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção de enzimas que atendam a necessidade de produzir enzimas mais eficientes (SUN & CHENG, 2002), mais estáveis e capazes de atuar em condições adversas. Em processos de pré-tratamento da biomassa, o pH da solução normalmente é ácido, podendo chegar a pHs abaixo de 3, e nestas condições o uso da endoglucanase descrita nesta patente pode ser muito vantajoso.

Assim, podemos concluir que aplicações envolvendo o uso das celulasas têm como barreira a ser vencida, o custo, o baixo rendimento das enzimas para sua aplicação industrial e a produção de enzimas em condições que garantem a obtenção do produto com características bioquímicas e enzimáticas necessárias para uma dada aplicação. Por isso há a necessidade de se obter enzimas industriais de maneira economicamente viável, estáveis, processivas e com níveis de glicosilação adequados para a aplicação desejada.

As endoglucanases e as celulasas em geral são classificadas em famílias de glicosil hidrolases (TOMME, VANTILBEURGH *et al.*, 1986), com base em sua sequência de aminoácidos e semelhanças de enovelamento (COUTINHO E HENRISSAT, 1999).

As endoglucanases (EC: 3.2.1.4) são classificadas nas famílias GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48 e 51 conforme a *Carbohydrate Active Enzymes database*.

A endoglucanase descrita na presente invenção pertence à família de hidrolases de glicosídeos (ou glicosil hidrolases, GHs) número 7, família esta conhecida também como GH7, e que difere em sequência de aminoácidos, peso molecular, enovelamento proteico, estrutura tridimensional, atividade e especificidade enzimática de outras enzimas das outras famílias de GHs.

Além disso, é válido ressaltar que é conhecido que as enzimas extracelulares produzidas pelos fungos filamentosos são normalmente glicosiladas e acredita-se que esta modificação pós-tradicional confere a estas enzimas maior solubilidade e estabilidade e aumenta resistência às proteases. Também é conhecido que a glicosilação das enzimas extracelulares introduzidas pelos fungos filamentosos é heterogênea e depende do tipo de fungo e das condições de cultivo, podendo variar bastante de microrganismo a microrganismo.

Isso faz com que as enzimas extracelulares produzidas e exportadas extracelularmente pelos fungos filamentosos possuam diferentes graus e tipos de glicosilação (O-glicosilação e N-glicosilação) podendo apresentar assim várias glicofomas da mesma enzima, frequentemente com propriedades bioquímicas e enzimáticas muito diferentes.

O mesmo se aplica a enzimas recombinantes, produzidas heterologamente pelos fungos e leveduras, que têm capacidade de glicosilar proteínas expressas de maneira diferente daquela conferida pelo microrganismo original

(expressão homóloga) e com graus e tipos de glicosilação que dependem das condições do cultivo (JEON *et. al.*, 2008). Portanto, a definição de condições de cultivo é fundamental para conferir a composição de glicoformas de uma enzima recombinante específica, produzida em um dado sistema de expressão.

Neste sentido, mesmo as enzimas de mesma família de hidrolases de glicosídeos, expressas em sistemas celulares diferentes e/ou provenientes de diferentes cepas do mesmo fungo, podem ter características bioquímicas e enzimáticas (pH ótimo, estabilidade frente a temperatura, especificidade por substrato e nível de atividade enzimática) distintas.

É importante ressaltar que enzimas são somente ativas em certa faixa de pH. Variações nessa faixa resultam em mudanças na forma iônica do sítio ativo e mudanças na atividade das enzimas, podendo também alterar a forma tridimensional da enzima e, portanto, na taxa da reação hidrolítica. A maior parte das enzimas hoje utilizadas é extraída de organismos mesófilos, portanto suas aplicações são em geral, restritas, devido à limitada estabilidade em temperaturas extremas e condições adversas de reação, como pH muito alterado (ácidos e alcalinos) e presença de solventes orgânicos (CARREA; COLOMBO, 2000). Desta maneira, a celulase aqui em questão, (Endoglucanase ácida da família de hidrolases de glicosídeos 7), reúne características bioquímicas desejadas e necessárias para aplicações industriais e biotecnológicas particularmente aqueles que exigem uso de pH muito ácidos (pH na faixa de 0,5 a 4).

Escolha do Processo de Expressão da Proteína

É importante mencionar, que no desenvolvimento da presente invenção, foi tentada a expressão da proteína em *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica (capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono), e que possui como característica importante, a capacidade de realizar várias modificações pós-traducionais características de eucariotos, tais como O e N-glicosilação. Porém, depois de realizado todo processo de clonagem e expressão, foi obtida uma secreção ineficiente da proteína de interesse com um rendimento mínimo.

Posteriormente, foi clonada e expressa a mesma proteína (Endoglucanase I) em *Escherichia coli*, a qual produziu considerável quantidade de proteína, porém toda em sua forma insolúvel, ou seja, em corpo de inclusão, impossibilitando seu uso em ensaios posteriores.

Dessa maneira, optou-se para expressão em fungo filamentososo, do gênero *Aspergillus*, que é um gênero grande e diversificado (~ 180 espécies), incluindo várias espécies bem conhecidas utilizadas em expressão heteróloga de proteínas tais como *A. nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. awamori*, etc. A opção foi pelo fungo *A. niger* que assim como os outros fungos filamentosos apresentam características fundamentais para sua escolha tais como: são facilmente cultivados, a expressão heteróloga de proteínas pode alcançar níveis de g/L, possuem toda a maquinária celular para as modificações pós traducionais tal como a glicosilação.

Portanto, a escolha do processo de produção de

endoqlucanase descrito na presente invenção é de fundamental importância para atingir o objetivo desejado (obtenção da enzima desejada com as condições bioquímicas desejadas).

5 **BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

A invenção descreve oligonucleotídeos para produção de endoglucanase, sequências para produção de endoglucanase, processo de obtenção de endoglucanase e usos da endoglucanase.

10 A enzima (Endoglucanase I), originária do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* cepa IOC-3844, é produzida heterologicamente em sistema de expressão *Aspergillus niger*, em condições descritas neste documento é perfeitamente estável em ambiente ácido e mantém sua
15 atividade na faixa de pHs entre 0,5 e 7, com atividade máxima entre pH 1,5 e 3.

Assim, observamos que o pH ótimo desta enzima é extremamente ácido (pH = 2) diferente de outras celulases de outros fungos ou mesmo dos fungos do gênero *Trichoderma*,
20 que de maneira geral apresentam pH ótimo na faixa de 4 a 5,5.

Além disso, quando produzida seguindo o processo revelado neste documento, a enzima mantém sua atividade em ampla faixa de pH ácido, chegando a pHs menores do que 1, o
25 que é interessante do ponto de vista econômico e industrial uma vez que, vários processos biotecnológicos e/ou agroindustriais utilizam pH ácidos.

Dessa forma, a enzima hidrolítica recombinante endoglucanase tem pH ótimo próximo de 2, possuindo grande
30 potencial para ser utilizada em processos biotecnológicos

e/ou agroindustriais que envolvem hidrólise de celulose, carboidratos e glicosídeos e utilizam pHs ácidos, tais como na indústria têxtil, indústria de papel e celulose, ração animal, indústria farmacêutica e agroindustrial, especialmente em condições que necessitam utilização de pH na faixa de 0,5 a 4.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção descreve oligonucleotídeos para produção de endoglucanase, sequências para produção de endoglucanase, processo de obtenção de endoglucanase e usos da endoglucanase.

Oligonucleotídeos (primers) para a produção de Endoglucanase

Para amplificação do gene de interesse foram desenhados oligonucleotídeos específicos (*primers*) de acordo com as sequências gênicas abaixo.

A sequência do gene inteiro da endoglucanase altamente acídica (Endoglucanase I do *T. harzianum* cepa IOC-3844) é apresentada conforme a SEQ. 2

Os *primers* utilizados para a clonagem da sequência do gene inteiro da endoglucanase são: primer forward fEGLI conforme a SEQ. ID. 2 e primer reverse fEGLI, conforme a SEQ. ID. 3.

Já para a amplificação da sequência do domínio catalítico da endoglucanase altamente acídica (Endoglucanase I do *T. harzianum* cepa IOC-3844) que se apresenta conforme a SEQ. ID. 4, os *primers* (oligonucleotídeos) utilizados são: primer forward catEGLI, conforme a SEQ ID. 5, o primer reverse catEGLI, conforme a SEQ. ID. 6 e o primer reverse 2, conforme a SEQ. ID. 8.

Sequências para produção de endoglucanase I (Egl I) de Trichoderma harzianum

A produção da proteína recombinante em questão foi obtida após a clonagem do gene da endoglucanase I (Egl I) de *Trichoderma harzianum*, utilizando biblioteca de cDNA previamente obtida como DNA molde. As duas construções gênicas utilizadas, uma da proteína inteira e outra apenas do domínio catalítico da mesma, conforme as SEQ 1 e 4, respectivamente, já que ambas possuem a característica ácida descrita.

A sequência SEQ. ID. 1 refere-se à sequência inteira utilizada para clonagem com resultado de produção de endoglucanase I e contém o gene de interesse inteiro, os primers e as caudas.

A sequência SEQ. ID. 7 refere-se à delimitação do domínio catalítico utilizada para clonagem com resultado de produção de endoglucanase I e contém o domínio catalítico do gene de interesse, os primers e as caudas.

As sequências foram pensadas utilizando a técnica conhecida como Gateway, que minimiza passos de clonagem e subclonagem, baseado em propriedades de recombinação sítio-específicas do bacteriófago lambda. Para facilitar os processos de clonagem de genes, este sistema elimina etapas de digestão com enzimas de restrição, ligações, géis e ampliações. Nesse sistema, a clonagem é realizada em duas reações.

Primeiro, deve ocorrer a recombinação entre sítios específicos de ligação (att), attB (bactéria) no gene de interesse e attP (phago) no vetor de entrada.

Após a recombinação, os sítios attB e attP originam os

sítios attL e attR. O vetor de entrada clonado, agora com os sítios attL pode ser recombinado com qualquer vetor de expressão que possua os sítios attR.

5 A recombinação ocorre entre uma região homóloga de cerca de 15 pb, mesmo assim, é necessária a adição uma sequência extra em torno dessa região, requerida pelas proteínas de recombinação. Para a construção da proteína em questão, foram adicionadas caudas aos oligonucleotídeos (primers).

10 **Processo de Obtenção de Endoglucanase I (Egl I)**

O processo de obtenção de endoglucanase apresenta as seguintes etapas:

a) Primeira Etapa de Clonagem;

- 15 a.1) Ligação do gene amplificado ao vetor;
- a.2) Transformação em *Escherichia coli* DH5 ou DH10b quimiocompetente ou eletrocompetente;
- a.3) Seleção das colônias positivas;
- a.4) Cultivo das colônias positivas;
- a.5) Centrifugação;
- 20 a.6) Purificação dos Plasmídeos;
- a.7) Digestão com a enzima de restrição;
- a.8) Liberação do Inseto;

b) Segunda Etapa de Clonagem: Recombinação LR;

- 25 b.1) Reação com vetor de destino escolhido, tampão, enzima, e preparação de miniprep do DNA de entrada;
- ~~b.2) Purificação;~~
- b.3) Análise do Plasmídeo pela digestão com a enzima de restrição BsrGI;

30 c) Preparação de Protoplasto;

c.1) Digestão enzimática da parede celular do micélio jovem;

c.2) Filtrada da cultura à vácuo;

c.3) Incubação de enzima e protoplasto;

5 c.4) Filtração à vácuo;

c.5) Adição de TB e protoplasto filtrado;

c.6) Centrifugação;

c.7) Coleta da camada intermediária;

c.8) Cálculo da quantidade de protoplasto;

10 c.9) Diluição para estoque e transformação;

d) Transformação em *Aspergillus niger* por metodologia Protoplasto - PEG;

d.1) Mistura de Protoplasto, DNA da SEQ. ID. 1 ou da SEQ. ID. 7, PEG, ATA;

15 d.2) Adição de Sorbitol;

d.3) Centrifugação;

d.4) Descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado;

d.5) Distribuição em placa com meio SRM;

20 d.6) Manutenção em estufa; e

e) Verificação da Capacidade de Expressão da Proteína;

f) Obtenção e Purificação da Proteína.

O referido processo produz enzima similar a endoglucanase altamente acídica, com nível de similaridade de pelo menos 80% às SEQ. ID. 1 ou SEQ ID. 4, em *Aspergillus niger* ou qualquer outro sistema de expressão.

Usos da Endoglucanase I (Egl I)

A endoglucanase I pode ser utilizada em etapas hidrólise de materiais celulósicos, carboidratos ou glicosídeos que ocorram em pH entre 0,5 e 4, com pH ótimo

30

aproximadamente em 2, em processos biotecnológicos, bioindustriais, agrotecnológicas, farmacêuticas e/ou agroindustriais; e mais especificamente na fabricação de ração animal, processos da indústria alimentícia incluindo a fabricação de alimentos para humanos, processos na indústria têxtil, processos na indústria química, processos de extração de chás, processos de fabricação de proteína de soja, processos de fabricação de óleos essenciais, processos de fabricação de aromatizantes, processos de produção de detergentes, processos de produção de polpa de celulose, processos de produção de papel, processos de tratamento de resíduos, processos de fermentação e produção de bioetanol, processos de produção de biocombustíveis líquidos.

O fato da enzima resistir e manter sua atividade quando testada contra ácido clorídrico (HCl) bem como ácido acético e ácido cítrico, permite sua aplicação em aumento da digestibilidade de ração animal e alimentação humana rica em fibras.

Exemplo de Processo de Obtenção de Endoglucanase I (Egl I) Primeira Etapa de Clonagem

A clonagem se deu através de um kit, contendo o vetor intermediário escolhido pDONR201 ou outro vetor comercial como os pET. A reação de ligação do gene amplificado ao vetor pDONR201, foi realizada conforme a seguinte reação contida no kit: 2 µL do tampão de reação clonase™ BP (5x); 0,5 µL de enzima clonase™ BP; 0,5 µL de tampão TRIS-EDTA (TE), pH 7,5 a 8,0, e 1 µL do produto attB-PCR.

As reações foram mantidas de 20 a 25°C por cerca de 1 hora e então, transformadas em bactéria *Escherichia coli*

DH5 quimiocompetente para a propagação de plasmídeo.

As colônias positivas para a seleção pelo antibiótico foram inoculadas em 1 mL de meio 2YT (1,6% de triptona, ou peptona 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl) ou LB e
5 cultivadas por aproximadamente 15 horas em temperatura de 30°C a 37°C, preferencialmente 30°C sob agitação de 150 a 220 rpm.

Os cultivos foram centrifugados e os plasmídeos purificados com um kit de purificação de gel conforme
10 instruções do fabricante.

Os vetores positivos foram confirmados através da digestão com a enzima de restrição BsrGI, mas pode-se escolher outras que sejam capazes de fazer a digestão, e respectiva liberação do inserto e então encaminhados para a
15 segunda etapa de clonagem, a recombinação LR.

Segunda Etapa de Clonagem: Recombinação LR

Esta etapa seguiu a reação: 2 µL do vetor de destino escolhido, preferencialmente o vetor de destino ANip7G (~30 ng/µL); 1 µL do tampão clonase™ LR; 0,5 µL de enzima
20 clonase™ LR; 0,5 µL de tampão TE pH8.0 e 1 µL da preparação de miniprep do DNA de entrada (clone pDONR BP).

Após novo processo de transformação e purificação, os plasmídeos foram analisados novamente quanto à inserção correta do gene ao vetor ANip7G, da mesma forma que para a
25 ligação BP ao pDONR201, através da digestão pela enzima de restrição BsrGI.

O vetor de expressão ANip7G se caracteriza por possuir os sítios inicial e terminal do promotor da glucoamilase de *A. niger* induzível por maltose ou amido; possui também o
30 marcador auxotrófico *pyrG*, que codifica a orotidina-5'-

monofosfato carboxilase necessária para a síntese da uridina, promovendo prototrofia à cepa mutante auxotrófica para uracila, além dos sítios de recombinação *attP* para a clonagem por Gateway.

5 Preparação de Protoplasto

Após o processo de clonagem, as construções foram transformadas em *Aspergillus niger*. Para isso, foi utilizado um sistema de transformação conhecido como Protoplasto - PEG, onde a transferência do DNA exógeno para os protoplastos é feita na presença de íons de cálcio e alta concentração de PEG os quais promovem o agrupamento dos protoplastos e aumentam a permeabilidade da membrana plasmática.

O protocolo para preparação dos protoplastos é realizado a partir da digestão enzimática da parede celular do micélio jovem. Para isso foi feito um inóculo contendo cerca de 2×10^6 esporos/mL em 200 a 250 mL de meio, incubado em shaker com agitação próxima de 100 rpm, em uma faixa de temperatura 28°C a 32°C dando preferência para 30°C, por aproximadamente 16 horas.

Essa cultura foi então filtrada a vácuo de preferência por sucção ou gravidade, utilizando-se uma membrana ou papel filtro, obtendo o micélio o qual foi filtrado e lavado com solução de 0,5 a 0,6 M $MgSO_4$. O micélio seco é transferido para um frasco previamente pesado para cálculo do peso. Utiliza-se cerca de 5 mL de solução osmótica (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 32 mM e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 M) para cada grama de micélio para diluir a enzima que fará a digestão da parede celular e, uma relação de 250 mg de coquetel enzimático para cada grama de micélio.

Enzima e protoplasto foram incubados em shaker com temperatura próxima de 30°C, sob agitação de cerca de 100 rpm, até que o grau de digestão da parede celular fosse satisfatório, isto é, quando observado a olho nu a mistura está bastante líquida e em microscópio não se observa mais hifas.

A mistura foi novamente filtrada a vácuo, de preferência por sucção ou gravidade e em um tubo de volume 50 mL foram adicionados volumes iguais de solução TB (Sorbitol 0,5 a 0,6 M e Tris-HCl 100 a 150 mM, pH 7,5 a 8) e da mistura de protoplasto filtrado. A amostra foi centrifugada cerca de 3750 rpm, em centrífuga refrigerada, por 20/30 minutos, após a qual podemos observar a formação de uma camada intermediária, coletada com uma pipeta e transferida para outro tubo, lavado com solução SC (Sorbitol 1M e CaCl₂ 66,2 mM) gelada até completar o volume de 40-50 mL. A amostra foi centrifugada novamente próximo de 3750 rpm, 4°C, por 5 minutos e teve o sobrenadante descartado. Em seguida, o pellet foi ressuspendido em cerca de 2 mL de solução SC.

Após os cálculos dos protoplastos em lâmina, os mesmos são diluídos em solução SC de forma que fiquem em uma concentração final de cerca de 5×10^7 protoplastos/ml, os quais serão utilizados no processo de transformação.

25 Transformação em *Aspergillus niger* por metodologia Protoplasto - PEG

~~O processo de transformação do protoplasto~~ com o vetor carregando o gene da Endoglucanase I para integração ao genoma do *A. niger*, é realizado misturando 100 a 200 µL de protoplasto (da ordem de 10^6 a 10^7 esporos/mL) com 10 µL de

DNA da SEQ. ID. 1 ou da SEQ. ID. 7 (pelo menos a 10 µg), 100 µl de PEG 4000 20% (em 1 M de Tris-HCL, pH 7,5 com 1M de NaCl₂) e 20 µL de 0,4 M de ATA por cerca de 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida são adicionados 1,5 mL de PEG 4000 60% (em 1 M de Tris-HCL, pH 7.5 com 1M de NaCl₂), mantido por 20 minutos a TA.

São adicionados então, 5 mL de 1,2M de sorbitol e centrifugados por 10 min em velocidade próxima a 3750 rpm e em TA. Após centrifugação, o sobrenadante é descartado e o precipitado ressuspendido para 1 mL de volume final com Meio de Regeneração Seletivo (SRM - 34 % de sucrose, 70,6 mM de NaNO₃, 6,7 mM de KCl, 11,1 mM de KH₂PO₄, 0,2 mM de KOH, 2 mM de MgSO₄.7H₂O e elementos traço).

Cada transformação é distribuída em pelo menos 3 placas redondas com diâmetro aproximado de 35mm (tipo Petri) com meio SRM com 1,5% de ágar, em volumes iguais, plaqueado e mantido em estufa úmida a 30°C por cerca de 6 dias.

Como a cepa *A. niger py11* utilizada possui marcador de seleção pyrG, sendo auxotrófico para uracila, o meio seletivo permite o crescimento somente das células que tiveram o DNA do vetor integrado ao seu genoma e que com isso adquiriram a capacidade de produzir uracila.

Verificação da Capacidade de Expressão da Proteína

Após ter sido observado o crescimento de várias colônias, foi preciso fazer uma triagem para testar a capacidade de expressão da proteína Endoglucanase I, tanto domínio catalítico quanto a proteína inteira. Para isso, as colônias crescidas após cerca de 7 dias, foram selecionadas e cada colônia, inoculada individualmente em 1mL de meio

MMJ (meio mínimo acrescido em 2 a 4% de maltose) em placas de 24 a 36 poços. As placas permaneceram em cultura estacionária por até 7 dias a 30°C e géis de SDS-PAGE, 15% de acrilamida, foram utilizados para o monitoramento do secretado pelas culturas entre 5 e 7 dias de cultivo.

As colônias detectadas como positivas e que expressavam a proteína de interesse, foram estocadas em sílica e a regeneração das mesmas realizada em placas com 1,5% de ágar e Meio de Regeneração Seletivo (SRM - 34 % de sucrose, 70,6 mM de NaNO₃, 6,7 mM de KCl, 11,1 mM de KH₂PO₄, 0,2 mM de KOH, 2 mM de MgSO₄.7H₂O e elementos traço), através do espalhamento da sílica ou glicerinado contendo a proteína de interesse e posterior incubação em estufa a 30°C por cerca de 7 dias para produção de esporos. Estes, foram coletados em solução salina (0,5% NaCl), contados para que entre 1x10⁶ 2x10⁶ esporos/mL sejam inoculados por litro de meio MMJ (meio mínimo com 2 a 4% de maltose), os quais foram divididos em 10 frascos do tipo erlen, contendo 0,5L cada e mantidos em cultura estacionária em estufa de 28°C a 30°C por de 5 a 6 dias.

Ao final deste tempo, a cultura foi filtrada através de uma membrana, concentrada por precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação por cerca de 12 horas em câmara fria ou local refrigerado. A amostra foi então centrifugada a 9000 rpm por 40 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de proteína ressuspendido em cerca de 20ml de tampão, que pode ser acetato, glicina, etc. porem escolhemos citrato de sódio 50mM pH 5.0.

Para verificar a produção e quantidade de proteína produzida, Géis de SDS-PAGE, 15% de acrilamida, foram

utilizados para o monitoramento do secretado pelas culturas do domínio catalítico e da proteína inteira. Para efetuar testes enzimáticos, é necessário obter a proteína em sua melhor pureza.

5 Obtenção da Proteína

Desta maneira, para purificação da proteína inteira e do domínio catalítico, o método adotado foi troca iônica, e para isso, foi escolhida a resina Phenyl-Sepharose, a qual apresenta a vantagem de dispensar a etapa de diálise após a precipitação com sal, o que representa economia de tempo, energia e aumenta as chances de manutenção da atividade enzimática. A resina foi lavada com água destilada e posteriormente equilibrada com tampão citrato de sódio em pH 4,5 a 5,0 contendo sulfato de amônio de 0,5 a 1 M. A injeção da amostra consistiu de 10mL da solução de enzima, mas pode haver variação nesse volume de 1 a 10ml, e a eluição foi alcançada por gradiente linear do tampão com inicial de 1M em gradiente salino decrescente do sal, e em seguida com tampão citrato de sódio em pH 4,5 a 5,0 sem sal.

O extrato extracelular do fungo *A. niger* após os 5-6 dias de cultivo apresenta-se com um baixo *background* de contaminantes por isso a purificação por troca hidrofóbica já nos rende o suficiente de proteína pura, em poucas etapas evitando perdas significativas de rendimento. Porém, após análise através de gel SDS page conseguimos identificar algumas frações contaminadas, que foram submetidas à purificação por gel filtração, também conhecida como cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 75 16/60 ou superdex 200 16/60 com tampão

citrato de sódio 50 mM, pH 4,5 a 5,0, NaCl em pelo menos 150 mM.

Para confirmação da pureza da proteína e da inexistência de possíveis contaminantes após o processo de purificação, a amostra foi submetida à SDS-PAGE corado com 5 nitrato de prata devido sua maior sensibilidade do método de visualização.

Embora a invenção tenha sido amplamente descrita, é óbvio para aqueles versados na técnica que várias 10 alterações e modificações podem ser feitas visando aprimoramento do projeto sem que as referidas alterações não estejam cobertas pelo escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

- 1- Oligonucleotídeo para produção de endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser primer forward fEGLI conforme a SEQ. ID. n° 2.
- 5 2- Oligonucleotídeo para produção de endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser primer reverse fEGLI conforme a SEQ. ID. n° 3.
- 3- Oligonucleotídeo para produção de endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser primer forward catEGLI
10 conforme a SEQ. ID. n° 5.
- 4- Oligonucleotídeo para produção de endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser primer reverse catEGLI conforme a SEQ. ID. n° 6.
- 5- Oligonucleotídeo para produção de endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser primer reverse 2 conforme a
15 SEQ. ID. n° 8.
- 6- Sequência para produção de endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser conforme a SEQ. ID. n° 1.
- 7- Sequência, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de ser utilizada na clonagem do
20 gene da endoglucanase I (Egl I) de *Trichoderma harzianum*.
- 8- Sequência para produção de endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser conforme a SEQ. ID. n° 7.
- 9- Sequência, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de ser utilizada na clonagem do
25 domínio catalítico do gene da endoglucanase I (Egl I) de *Trichoderma harzianum*.
- 10- Processo de Obtenção de Endoglucanase, **caracterizado** pelo fato de compreender as seguintes etapas:
- 30 a) Primeira Etapa de Clonagem;

- a.1) Ligação do gene amplificado ao vetor;
- a.2) Transformação em *Escherichia coli* DH5 ou DH10b quimiocompetente ou eletrocompetente;
- a.3) Seleção das colônias positivas;
- 5 a.4) Cultivo das colônias positivas;
- a.5) Centrifugação;
- a.6) Purificação dos Plasmídeos;
- a.7) Digestão com a enzima de restrição;
- a.8) Liberação do Inseto;
- 10 b) Segunda Etapa de Clonagem: Recombinação LR;
- b.1) Reação com vetor de destino escolhido, tampão, enzima, e preparação de miniprep do DNA de entrada;
- b.2) Purificação;
- 15 b.3) Análise do Plasmídeo pela digestão com a enzima de restrição BsrGI;
- c) Preparação de Protoplasto;
- c.1) Digestão enzimática da parede celular do micélio jovem;
- 20 c.2) Filtrada da cultura à vácuo;
- c.3) Incubação de enzima e protoplasto;
- c.4) Filtração à vácuo;
- c.5) Adição de TB e protoplasto filtrado;
- c.6) Centrifugação;
- 25 c.7) Coleta da camada intermediária;
- c.8) Cálculo da quantidade de protoplasto;
- c.9) Diluição para estoque e transformação;
- d) Transformação em *Aspergillus niger* por metodologia Protoplasto - PEG;
- 30 d.1) Mistura de Protoplasto, DNA da SEQ. ID. 1 ou

da SEO. ID. 7, PEG, ATA;

d.2) Adição de Sorbitol;

d.3) Centrifugação;

d.4) Descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado;

d.5) Distribuição em placa com meio SRM;

d.6) Manutenção em estufa; e

e) Verificação da Capacidade de Expressão da Proteína

f) Obtenção e Purificação da Proteína.

10 11- Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato do processo produzir enzima similar a endoglucanase altamente acídica, com nível de similaridade de pelo menos 80% às SEQ. ID. 1 ou SEQ ID. 4, em *Aspergillus niger* ou qualquer outro sistema de expressão.

15 12- Usos da Endoglucanase **caracterizado** pelo fato de ser em etapas hidrólise de materiais celulósicos, carboidratos ou glicosídeos que ocorram em pH entre 0,5 e 4, com pH ótimo aproximadamente em 2, em processos biotecnológicos, bioindustriais, agrotecnológicas, farmacêuticas e/ou agroindustriais; e mais especificamente na fabricação de ração animal, processos da indústria alimentícia incluindo a fabricação de alimentos para humanos, processos na indústria têxtil, processos na indústria química, processos de extração de chás, processos de fabricação de proteína de soja, processos de fabricação de óleos essenciais, processos de fabricação de aromatizantes, processos de produção de detergentes, processos de produção de polpa de celulose, processos de produção de papel, processos de tratamento de resíduos,

...processos de fermentação e produção de bioetanol, processos de produção de biocombustíveis líquidos.

RESUMO

**OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE,
SEQUÊNCIAS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, PROCESSO DE
OBTENÇÃO DE ENDOGLUCANASE E USOS DA ENDOGLUCANASE**

5 A invenção descreve oligonucleotídeos para produção de endoglucanase, sequências para produção de endoglucanase, processo de obtenção de endoglucanase e usos da endoglucanase.

A enzima hidrolítica recombinante endoglucanase tem
10 pH ótimo próximo de 2, possuindo grande potencial para ser utilizada em processos biotecnológicos e/ou agroindustriais que envolvem hidrólise de celulose, carboidratos e glicosídeos e utilizam pHs ácidos, tais como na indústria têxtil, indústria de papel e celulose, ração animal,
15 indústria farmacêutica e agroindustrial, especialmente em condições que necessitam utilização de pH na faixa de 0,5 a 4.

Listagem Endoglucanase.txt
SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
<120> OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, SEQUÊNCIAS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ENDOGLUCANASE E USOS DA ENDOGLUCANASE
<130> 13.1.190.76.9 ENDOGLUCANASE
<160> 8
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 1416
<212> DNA
<213> Trichoderma harzianum
<400> 1
atggctctct ctggccctt cccgctagct acggctgccc ttattgcatt tattgcccaa 60
attggtgccg gtcagcaacc tggaaaccagc actcccgagg tccatcccaa gttaacgacc 120
tacaagtgca caaatctgg aggatgtgtg gctcaggaca cctctgtcgt ccttgactgg 180
aactaccgct ggatgcacga caagaacttc aactcgtgca ccgtcaatgg cggagtaaata 240
accactcttt gccctgatga agcgacttgt ggtgccaaact gcttcacga gggcgctcga 300
tacgctgcct ctggtgtcac ggtctcgggt agctctctca ccatgaacca gtacatgccc 360
agcagttctg gcggatatag cagcgtatct ccacgactct atcttttggg atctgatgga 420
gactatgagc tgcttcagt gaacggccaa gagctgagct tcgatgtcga cctctcaact 480
ctgccctgtg gagagaacgg cgccctttac ctctccgaaa tggccgcaa tgggtggtgcc 540
aaccagtaca acacagctgg cgccaactat ggaagcgggt attgcatgac ccagtgcacc 600
gtccagacct ggaagaatgg taccctcaac actaaccatt caggctactg ctgcaacgag 660
atggatatcc ttgaagccaa ctcaagagcc aatgcattca ctctcactc ttgacgggcc 720
actgcttgcg atgccagcgg ttgctgcttc aaccctctac caaacggatt ccaacgctac 780
tggggccctg ggttcacact tgatacctcc aaggcttca ccatcattac acagttcaac 840
acagacaatg gttgccttc cggtaacctt gtgagcatta cacgcaagta tagacagaat 900
ggcgttgacg tcccagtgct tcaatctgga ggtgacacta tttcatcttg cccgtctgct 960
tcagcctacg gtggtctcac aacctgggc aaggctctgg caaacggcat ggtattggtg 1020
ttcagcatct ggaacgataa cggcggaaac atgaactggc tggatagcgg caatgccggt 1080
ccctgcagca gcacagagg caaccctcc accattgttg ccaacaacc gggcactcat 1140
gtcatcttct ccaacatccg atggggagat attggttcaa ccaactggctc aaccggcgggt 1200
aaccctctc ccagcacatc tagaacctcc accacgcctc ctcccagc gaccctgaga 1260
acttccactt caagcaggac gactacctcg agtgctgcag gctgcactca aaccactgg 1320
ggccagtgtg gcggtaacgg atataccggc tgcaagattt gcacagcagg cacaacttgc 1380
cagtatagca acgattacta ctcgcaatgc ctatag 1416

Listagem Endoglucanase.txt

<210> 2
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220> PRIMER_BIND

 <400> 2
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tggctctctc tgggcc 46

 <210> 3
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220> PRIMER_BIND

 <400> 3
 atgatgatga tgatgatggg atccacgagg aaccagctat aggcattgag agtagtaatc 60

 <210> 4
 <211> 1185
 <212> DNA
 <213> Trichoderma harzianum

 <400> 4
 atggctctct ctggtccctt cccgctagct acggctgccc ttattgcatt tattgccc 60
 attgttgccg gtcagcaacc tggaaccagc actcccagag tccatcccaa gttaacgacc 120
 tacaagtgca caaaatctgg aggatgtgtg gctcaggaca cctctgtcgt ccttgactgg 180
 aactaccgct ggatgcacga caagaactc aactcgtgca ccgtaaatgg cggagtaa 240
 accactcttt gccctgatga agcgacttgt ggtgccaact gcttcatcga gggcgctgac 300
 tacgctgcct ctggtgtcac ggtctcgggt agctctctca ccatgaacca gtacatgccc 360
 agcagttctg gcggatatag cagcgtatct ccacgactct atcttttggg atctgatgga 420
 gactatgagc tgcttcagtt gaacggccaa gagctgagct tcgatgtcga cctctcaact 480
 ctgccctgtg gagagaacgg cgccctttac ctctccgaaa tggccgcaaa tgggtggtgcc 540
 aaccagtaca acacagctgg cgccaactat ggaagcgggt attgcatgac ccagtgcccc 600
 gtccagacct ggaagaatgg taccctcaac actaaccatt caggctactg ctgcaacgag 660
 atggatatcc ttgaagccaa ctcaagagcc aatgcattca ctctcactc ttgcacggcc 720
 actgcttgcg atgccagcgg ttgaggcttc aaccctacg caaacggatt ccaacgctac 780
 tggggccctg ggttcacact tgatacctcc aaggcttca ccatcattac acagttcaac 840
 acagacaatg gtttgccctc cgtaacctt gtgagcatta cacgcaagta tagacagaat 900
 ggcggtgacg tcccaggtgc tcaatctgga ggtgacacta tttcatcttg cccgtctgct 960
 tcagcctacg gtggtctcac aaccatgggc aaggctctgg caaacggcat ggtattggta 1020
 ttcagcatct ggaacgataa cggcggaaac atgaactggc tggatagcgg caatgccggg 1080
 ccctgcagca gcacagaggg caaccgtcc accattggtg ccaacaacc gggcactcat 1140

Listagem Endoglucanase.txt

otcatcttct ccaacatccg atggggagat attggttcaa ccaact 1185

<210> 5
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220> PRIMER_BIND

<400> 5

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tggctctctc tggctcc 46

<210> 6
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220> PRIMER_BIND

<400> 6

atgatgatga tgatgatggg atccacgcgg aaccagagtg gttgaaccaa tatctcccc 59

<210> 7
 <211> 1224
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<400> 7

atggctctct ctggtccctt cccgctagct acggctgccc ttattgcatt tattgcccac 60
 attggtgccg gtcagcaacc tgggaaccagc actccccgagg tccatcccaa gttaacgacc 120
 tacaagtgca caaaatctgg aggatgtgtg gctcaggaca cctctgtcgt ccttgactgg 180
 aactaccgct ggatgcacga caagaacttc aactcgtgca ccgtaaatgg cggagtaaata 240
 accactcttt gccctgatga agcgacttgt ggtgccaaact gcttcatcga gggcgtcgac 300
 tacgctgcct ctggtgtcac ggtctcgggt agctctctca ccatgaacca gtacatgcc 360
 agcagttctg gcggatatag cagcgtatct ccacgactct atcttttggg atctgatgga 420
 gactatgagc tgcttcagtt gaacggccaa gagctgagct tcgatgtcga cctctcaact 480
 ctgccctgtg gagagaacgg cgccctttac ctctccgaaa tggccgcaaa tgggtggtgcc 540
 aaccagtaca acacagctgg cgccaactat ggaagcgggt attgcatgac ccagtgcacc 600
 gtccagacct ggaagaatgg taccctcaac actaaccatt caggctactg ctgcaacgag 660
 atggatatcc ttgaagccaa ctcaagagcc aatgcattca ctctcactc ttgcacggcc 720
 actgcttgcg atgccagcgg ttgaggcttc aaccctacg caaacggatt ccaacgctac 780
 tggggccctg ggttcacact tgatacctcc aaggctctca ccatcattac acagttcaac 840
acagacaatg gtttgccttc cggtaacctt gtgagcatta cacgcaagta tagacagaat 900
 ggcggtgacg tcccagatgc tcaatctgga ggtgacacta tttcatcttg cccgtctgct 960
 tcagcctacg gtggtctcac aaccatgggc aaggctctgg caaacggcat ggtattggta 1020
 ttcagcatct ggaacgataa cggcggaaac atgaactggc tggatagcgg caatgccgggt 1080

Listagem Endoglucanase.txt

ccctgcagca gcacagaggg caaccgtcc accattgttg ccaacaaccc gggcactcat 1140

gtcatcttct ccaacatccg atggggagat attggttcaa cactctggt tccgcgtgga 1200

tccatcatc atcatcatca ttga 1224

<210> 8

<211> 60

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220> PRIMER_BIND

<400> 8

gggaccact ttgtacaaga aagctgggtt caatgatgat gatgatgatg ggatccacgc 60

Consulta à Base de Dados do INPI

[Início | Ajuda?]

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#)

1/1

Depósito de pedido nacional de Patente

- (21) Nº do Pedido: **BR 10 2013 010809 0 A2**
- (22) Data do Depósito: 02/05/2013
- (43) Data da Publicação: 30/06/2015
- (47) Data da Concessão: -
- (51) Classificação - IntCL: **C12N 15/56 ; C11D 3/386 ; C12N 9/42 ; C12R 1/685 ; C12R 1/885 ; D06M 16/00 ; A23K 10/14 ; A23L 5/00**
- (54) Título: OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, SEQUÊNCIAS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ENDOGLUCANASE E USOS DA ENDOGLUCANASE
OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, SEQUÊNCIAS PARA PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ENDOGLUCANASE E USOS DA ENDOGLUCANASE. A invenção descreve oligonucleotídeos para produção de endoglucanase, sequências para produção de endoglucanase, processo de obtenção de endoglucanase e usos
- (57) Resumo: da endoglucanase. A enzima hidrolítica recombinante endoglucanase tem pH ótimo próximo de 2, possuindo grande potencial para ser utilizada em processos biotecnológicos e/ou agroindustriais que envolvem hidrólise de celulose, carboidratos e glicosídeos e utilizam pHs ácidos, tais como na indústria têxtil, indústria de papel e celulose, ração animal, indústria farmacêutica e agroindustrial, especialmente em condições que necessitam utilização de pH na faixa de 0,5 a 4.
- (71) Nome do Depositante: Universidade de São Paulo - USP (BR/SP)
- (72) Nome do Inventor: Igor Polikarpov / Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini / Viviane Isabel Serpa
- (74) Nome do Procurador: Maria Aparecida de Souza

Petições ?

Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Serviço	Cliente	Delivery	Data
✓	800160182579	30/06/2016	- - -	220	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP		-
✓	800150190746	27/07/2015	- - -	203	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP		-
✓	800150138315	02/06/2015	- - -	220	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP		-
✓	018130020603	19/06/2013	- - -	260	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP		-
✓	018130014573	02/05/2013	- - -	200	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP		-

Publicações ?

RPI	Data RPI	Despacho	Img	Complemento do Despacho
2380	16/08/2016	15.11	- -	As classificações anteriores eram: C12N 15/56; C12N 9/42; C12R 1/885; C12R 1/685; A23K 1/00; A23L 1/00; D06M 16/00; C11D 3/386
2321	30/06/2015	3.1	- -	
2250	18/02/2014	2.1	 -	
2211	21/05/2013	2.10	- -	Número de Protocolo 18130014573 em 02/05/2013 01:35(SP).

Dados atualizados até **04/10/2016** - Nº da Revista: **2387****Documentos Publicados**

RPI 2321