



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 037**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/00** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C11D 3/00** (2006.01)

**C11D 7/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05722431 .3**

96 Fecha de presentación : **14.01.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1709163**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Métodos para degradar materiales lignocelulósicos.**

30 Prioridad: **16.01.2004 US 537452 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.04.2011**

73 Titular/es: **NOVOZYMES, Inc.**  
**1445 Drew Avenue**  
**Davis, California 95616, US**

72 Inventor/es: **Vlasenko, Elena;**  
**Cherry, Joel y**  
**Xu, Feng**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 357 037 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para degradar materiales lignocelulósicos.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para degradar materiales lignocelulósicos.

10 **Descripción de las técnicas relacionadas**

15 La mayoría de los carbohidratos en las plantas están en forma de lignocelulosa, que está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina. La lignocelulosa se encuentra, por ejemplo, en los tallos, las hojas, el hollejo, las cáscaras y las mazorcas de plantas. La hidrólisis de estos polímeros libera una mezcla de azúcares neutros incluidos glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa.

20 La celulosa es un polímero de la glucosa de azúcar simple unido covalentemente por enlaces beta-1-4. Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos unidos por beta. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas, glucohidrolasas y beta-glucosidasas. Las endoglucanasas digieren el polímero de celulosa en lugares aleatorios, abriéndolo al ataque por parte de las celobiohidrolasas. Las glucohidrolasas liberan moléculas de glucosa a partir de los extremos del polímero de celulosa. Las celobiohidrolasas liberan consecutivamente moléculas de celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero de glucosa hidrosoluble de enlaces beta-1,4. Las beta-glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa.

25 Las hemicelulosas son heteropolisacáridos de cadena corta ramificada que están compuestas por varias hexosas (glucosa, manosa y galactosa), pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), ácidos urónicos, ácido acético y otros azúcares menores. Similar a la degradación de celulosa, la hidrólisis de hemicelulosa requiere acción coordinada de muchas enzimas, que pueden colocarse en tres categorías generales: las enzimas endo activas que atacan los enlaces internos dentro de la cadena polisacárida, las enzimas exo activas que actúan de manera consecutiva desde el extremo reductor o no reductor de la cadena polisacárida, y las enzimas accesorias (acetilsterasas y esterasas que hidrolizan enlaces glucosídicos de lignina).

35 Los materiales lignocelulósicos, tales como la madera, el material herbáceo, los residuos agrícolas, la fibra de maíz, los desechos de papel, pulpa y los residuos de fábrica de papel, pueden utilizarse para producir etanol. Ningún organismo natural conocido puede rápidamente y eficazmente metabolizar todos los polímeros de carbohidrato en la biomasa lignocelulósica en etanol. La conversión de materias primas lignocelulósicas en etanol tiene las ventajas de la disponibilidad inmediata de cantidades grandes de materia prima, la conveniencia de evitar quemar los materiales o utilizarlos para relleno sanitario y la limpieza del combustible de etanol. Una vez que la celulosa se convierte en glucosa, la glucosa es fácilmente fermentada por la levadura en etanol.

40 No obstante, un obstáculo para la comercialización es el coste de las enzimas para convertir el material lignocelulósico en glucosa y otros azúcares fermentables. Hay una necesidad en la técnica de mejorar la capacidad de las enzimas celulolíticas para degradar materiales lignocelulósicos en productos orgánicos útiles o en productos intermedios a productos finales útiles.

45 Ericsson, T. *et al.*, (2002) *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 31, n.º 3:353-364 divulga que en la hidrólisis de tensioactivos no iónicos de abeto pretratado con vapor mejoró la hidrólisis enzimática en un 30-45%.

50 Es un objeto de la presente invención mejorar la capacidad de las enzimas celulolíticas para degradar materiales lignocelulósicos.

**Resumen de la invención**

55 La presente invención se refiere a métodos para degradar un material lignocelulósico, que comprende: tratar el material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas celulolíticas en presencia de al menos un tensioactivo donde el tensioactivo es un alcohol etoxilado secundario, donde la presencia del tensioactivo aumenta la degradación de material lignocelulósico en comparación con la ausencia del tensioactivo.

60 La presente invención también se refiere a métodos para producir una sustancia orgánica, que comprende:

(a) sacarificar un material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas celulolíticas en presencia de al menos un tensioactivo donde el tensioactivo es un alcohol etoxilado secundario, donde la presencia del tensioactivo aumenta la degradación de material lignocelulósico en comparación con la ausencia del tensioactivo;

65 (b) fermentar el material lignocelulósico sacarificado del paso (a) con uno o más microorganismos fermentativos; y

(c) recuperar la sustancia orgánica de la fermentación.

## ES 2 357 037 T3

En una forma de realización preferida, la sustancia orgánica es alcohol.

### Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 muestra un mapa de restricción de pAILo1.
- La Figura 2 muestra un mapa de restricción de pMJ04.
- La Figura 3 muestra un mapa de restricción de pCaHj527.
- 10 La Figura 4 muestra un mapa de restricción de pMT2188.
- La Figura 5 muestra un mapa de restricción de pCaHj568.
- 15 La Figura 6 muestra un mapa de restricción de pMJ05.
- La Figura 7 muestra la secuencia de ADN (SEC ID n.º: 26) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n.º: 27) de la secuencia señal de secreción de una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.
- 20 La Figura 8 muestra la secuencia de ADN (SEC ID n.º: 30) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n.º: 31) de la secuencia señal de secreción de una endoglucanasa V de *Humicola insolens*.
- La Figura 9 muestra un mapa de restricción de pSMai135.
- 25 Las Figuras 10A y 10B muestran la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de una beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID n.os: 36 y 37, respectivamente). El péptido señal predicho es subrayado y los intrones predichos aparecen en cursiva.
- La Figura 11 muestra un mapa de restricción de pBANE10.
- 30 La Figura 12 muestra un mapa de restricción de pAILo2.
- La Figura 13 muestra un mapa de restricción de pEJG97.
- 35 La Figura 14 muestra un mapa de restricción de pMJ06.
- La Figura 15 muestra un mapa de restricción de pMJ09.
- La Figura 16 muestra un mapa de restricción de pJZHEG1.
- 40 La Figura 17 muestra el efecto del Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS) en la hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1,5L a 50°C.
- La Figura 18 muestra el efecto de Lutensol® AT80 (0,1 ml/g PCS) en la hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1,5L a 50°C.
- 45 La Figura 19 muestra el efecto del Softanol® 90 (0,2 ml/g PCS) en la hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1,5L a 50°C.
- La Figura 20 muestra el efecto de Softanol® 90 (0,2 ml/g PCS) en la hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1,5L a 55°C.
- 50 La Figura 21 muestra la dependencia de dosis de Softanol® 90 para la hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1,5L (2 mg/g PCS) a 50°C.
- 55 La Figura 22 muestra el efecto de diferentes productos de Softanol® en la hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1,5L (2 mg/g PCS) a 50°C.
- La Figura 23 muestra el efecto de Softanol® 90 (0,2 ml/g PCS) en la hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1,5L (2 mg/g PCS) suplementada con beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (0,06 mg/g PCS) y caldo libre de célula de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de expresión de *Trichoderma reesei* (2 mg/g PCS) a 50°C.
- 60 La Figura 24 muestra el efecto de Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS) en conversión de 24 horas de PCS molido/lavado con etanol (1%) por celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* purificada (2-10 mg/g PCS) a 40-65°C.
- 65 La Figura 25 muestra el efecto de Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS) en conversión de 24 horas de PCS molido/ lavado con etanol (1%) por celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* purificada (2-10 mg/g PCS) suplementado con 5% beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (0,1-0,5 mg/g PCS) a 40-65°C.

## ES 2 357 037 T3

La Figura 26 muestra el efecto de Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS) en conversión de 24 horas de PCS molido/lavado con etanol (1%) por celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* purificada (2-20 mg/g PCS) suplementado con 20% de endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (0,4-4 mg/g PCS) y 5% de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (0,1-1 mg/g PCS) a 40-65°C.

La Figura 27 muestra el efecto de Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS) en conversión de 24 horas de PCS molido/lavado con etanol (1%) por celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* purificada (2-20 mg/g PCS) suplementado con 20% de E1cd de *Acidothermus cellulolyticus* (0,4-4 mg/g PCS) y 5% de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (0,1-1 mg/g PCS) a 40-65°C.

La Figura 28 muestra el efecto de Softanol® (0,05-0,2 ml/g celulosa) en hidrólisis de Avicel (1%) por Celluclast 1,5L (1,25-20 mg/celulosa) a 50°C.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos para degradar un material lignocelulósico, que comprende: tratar el material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas celulolíticas en presencia de al menos un tensioactivo donde el tensioactivo es un alcohol etoxilado secundario, donde la presencia del tensioactivo aumenta la degradación de material lignocelulósico en comparación con la ausencia del tensioactivo.

#### Material lignocelulósico

En los métodos de la presente invención, el material lignocelulósico puede ser cualquier material que contenga lignocelulosa. La lignocelulosa generalmente se encuentra, por ejemplo, en los tallos, las hojas, los hollejos, las cáscaras y las mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de árboles. El material lignocelulósico también puede ser, a título enunciativo y no limitativo, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, desperdicios sólidos municipales, desechos de papel y pulpa y residuos de fábricas de papel.

En una forma de realización preferida, el material lignocelulósico es forraje de maíz. En otra forma de realización preferida, el material lignocelulósico es fibra de maíz. En otra forma de realización preferida, el material lignocelulósico es la paja de arroz. En otra forma de realización preferida, el material lignocelulósico es desperdicios del tratamiento del papel y de la pulpa. En otra forma de realización preferida, el material lignocelulósico son plantas herbáceas o leñosas.

El material lignocelulósico puede ser utilizado tal como está o se puede someter a un pretratamiento usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, las técnicas de pretratamiento físicas pueden incluir varios tipos de molienda, irradiación, vaporización/explosión de vapor e hidrotermólisis; las técnicas de pretratamiento químicas pueden incluir ácido diluido, solvente orgánico alcalino, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono e hidrotermólisis con pH controlado; y las técnicas de pretratamiento biológicas pueden incluir la aplicación de microorganismos de solubilización de lignina (véase, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol., 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, 65: 207-241; Olsson, L., y Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech., 18: 312-331; y Vallander, L., y Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Engl. Biotechnol., 42: 63-95).

#### Tensioactivos

En los métodos de la presente invención, el tensioactivo es un alcohol etoxilado secundario. El tensioactivo se añade exógenamente.

Un tensioactivo de alcohol etoxilado secundario tiene la fórmula  $C_{11-15}H_{23-31}O(CH_2CH_2O)_xH$ , donde x es el grado de etoxilación. El grado de etoxilación puede ser de 3 como mínimo a 50 como máximo. En una forma de realización preferida, el alcohol etoxilado secundario es alquioxipolietilenoxtetanol 50 (x=5). En otra forma de realización preferida, el alcohol etoxilado secundario es alquioxipolietilenoxtetanol 90 (x=9). En otra forma de realización preferida, el alcohol etoxilado secundario es alquioxipolietilenoxtetanol 120 (x=12). En otra forma de realización preferida, el alcohol etoxilado secundario es alquioxipolietilenoxtetanol 200 (x=20). Ejemplos de tensioactivos de alcohol etoxilado secundarios disponibles comercialmente incluyen, de manera enunciativa y no limitativa, SOFTANOL™ 50, SOFTANOL™ 90, SOFTANOL™ 120, y SOFTANOL™ 200, obtenible de INEOS Oxide, Zwiijndrecht, Bélgica.

En la tabla 1 se muestra un resumen de los tensioactivos mencionados más arriba.

TABLA 1

Tensioactivo	Química	Proveedor	PM	CP °C	HLB	EO Mol n.º	Apariencia
Softanol 50	AE secundario C <sub>11-15</sub> H <sub>23-31</sub> O(EO) <sub>5</sub> H	Honeywell & Stein/INEOS Oxide	420	<0	10.5	5	Líquido
Sofftanol 90	AE secundario C <sub>11-15</sub> H <sub>23-31</sub> O(EO) <sub>9</sub> H	Honeywell & Stein/INEOS Oxide	600	56	13.3	9	Líquido
Softanol 120	AE secundario C <sub>11-15</sub> H <sub>23-31</sub> O(EO) <sub>12</sub> H	Honeywell & Stein/INEOS Oxide	730	83	14.5	12	Cera (Líquido a 30°C)
Softanol 200	AE secundario C <sub>11-14</sub> H <sub>23-31</sub> O(EO) <sub>2</sub> OH	Honeywell & Stein/INEOS Oxide	1080	NA		20	Sólido
AE: alcohol etoxilado							

#### Enzimas celulolíticas

En los métodos de la presente invención, la enzima celulolítica puede ser cualquier enzima implicada en la degradación de lignocelulosa a glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa. La enzima celulolítica puede ser una preparación enzimática de varios componentes, por ejemplo, celulasa, una preparación enzimática monocomponente, por ejemplo, endoglucanasa, celobiohidrolasa, glucohidrolasa, beta-glucosidasa, o una combinación de enzimas monocomponentes y de varios componentes. Las enzimas celulolíticas pueden tener actividad, es decir, hidrolizar celulosa, en el rango de pH ácido, neutro o alcalino.

La enzima celulolítica puede ser de origen bacteriano o fúngico, que puede ser obtenible o aislada y purificada de microorganismos que se conocen por ser capaces de producir enzimas celulolíticas de, por ejemplo, especies *Humicola*, *Coprinus*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scytalidium*, *Penicillium* o *Aspergillus* (véase, por ejemplo, EP 458162), especialmente aquellos producidos por una cepa seleccionada de la especie *Humicola insolens* (reclasificado como *Scytalidium thermophilum*, véase, por ejemplo, patente estadounidense n.º 4.435.307), *Coprinus cinereus*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Meripilus giganteus*, *Thielavia terrestris*, *Acremonium* sp., *Acremonium persicinum*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium brachyphenium*, *Acremonium dichromosporum*, *Acremonium obclavatum*, *Acremonium pinkertoniae*, *Acremonium roseogriseum*, *Acremonium incoloratum* y *Acremonium furatum*; preferiblemente de especies de las especies *Humicola insolens* DSM 1800, *Fusarium oxysporum* DSM 2672, *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, *Cephalosporium* sp. RYM-202, *Acremonium* sp. CBS 478.94, *Acremonium* sp. CBS 265.95, *Acremonium persicinum* CBS 169.65, *Acremonium acremonium* AHU 9519, *Cephalosporium* sp. CBS 535.71, *Acremonium brachyphenium* CBS 866.73, *Acremonium dichromosporum* CBS 683.73, *Acremonium obclavatum* CBS 311.74, *Acremonium pinkertoniae* CBS 157.70, *Acremonium roseogriseum* CBS 134.56, *Acremonium incoloratum* CBS 146.62 y *Acremonium furatum* CBS 299.70H. Las enzimas celulolíticas también pueden ser obtenidas a partir de *Trichoderma* (particularmente *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma koningii*), *Bacillus* alcalofílico (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 3.844.890 y EP 458162) y *Streptomyces* (véase, por ejemplo, EP 458162).

Las enzimas celulolíticas usadas en los métodos de la presente invención se pueden producir por fermentación de las cepas microbianas mencionadas anteriormente en un medio nutritivo con fuentes de nitrógeno y carbono y sales

inorgánicas adecuadas, usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bennett, J.W. y LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Los medios adecuados se encuentran disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de American Type Culture Collection). Los rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de celulasa se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Bailey, J.E., y Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula que dé como resultado la expresión o el aislamiento de una enzima celulolítica. Puede entenderse, entonces, que la fermentación comprende el cultivo en matraz de agitación, la fermentación a escala grande o pequeña (incluidas, fermentaciones continuas, de lote, en flujo discontinuo o en estado sólido) en laboratorio o fermentos industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que la celulasa sea expresada o aislada.

Las enzimas celulolíticas resultantes producidas por los métodos anteriormente descritos pueden ser recuperadas del medio de fermentación por procedimientos convencionales incluidos, a título enunciativo y no limitativo, centrifugado, filtración, secado por pulverización, evaporación o precipitación. La enzima recuperada luego puede ser purificada adicionalmente por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar.

La celulasa hidroliza carboximetilcelulosa (CMC), disminuyendo así la viscosidad de la mezcla de incubación. La reducción resultante en la viscosidad se puede determinar por un viscosímetro de vibración (p. ej., MIVI 3000 de Sofraser, Francia). La determinación de la actividad de la celulasa, medida en función de la unidad de viscosidad de celulasa (CEVU), cuantifica la cantidad de actividad catalítica presente en una muestra midiendo la capacidad de la muestra de reducir la viscosidad de una solución de carboximetilcelulosa (CMC). El ensayo se realiza a 40°C en tampón fosfato 0,1 M pH 9,0 durante 30 minutos con CMC como sustrato (33,3 g/L carboximetilcelulosa Hercules 7 LFD) y una concentración enzimática de aproximadamente 3,3-4,2 CEVU/ml. La actividad CEVU se calcula en relación a un estándar de enzima declarado, tal como Celluzyme™ Standard 17-1194 (obtenido de Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca).

Ejemplos de celulastas adecuados para el uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLUCLAST™ (disponible de Novozymes A/S) y NOVOZYM™ 188 (disponible de Novozymes A/S). Otras preparaciones disponibles comercialmente que comprenden celulasta que pueden ser usadas incluyen CELLUZYME™, CEREFLO™ y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAMINEX™ y SPEZYME™ CP (Genencor Int.) y ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH). Las enzimas de celulasa se agregan en cantidades eficaces desde aproximadamente 0,001% a aproximadamente 5,0% en peso de sólidos, más preferiblemente de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 4,0% en peso de sólidos, y de forma más preferible, de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 2,0% en peso de sólidos.

Como se ha mencionado anteriormente, las enzimas celulolíticas usadas en los métodos de la presente invención pueden ser preparaciones monocomponentes, es decir, un componente esencialmente libre de otros componentes de celulasa. El único componente puede ser un componente recombinante, es decir, producido por clonación de una secuencia de ADN que codifica el único componente y célula posterior transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (véase, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244). Otros ejemplos de enzimas celulolíticas monocomponentes incluyen, de modo enunciativo y no limitativo, los descritos en JP 07203960-A y WO-9206209. El huésped es preferiblemente un huésped heterólogo (la enzima es externa al huésped), pero el huésped, bajo ciertas condiciones, también puede ser un huésped homólogo (la enzima es nativa al huésped). Las enzimas celulolíticas monocomponentes también pueden ser preparadas purificando tal enzima de un medio de fermentación.

Ejemplos de enzimas celulolíticas monocomponentes útiles en la práctica de los métodos de la presente invención incluyen, de modo enunciativo y no limitativo, endoglucanasa, celobiohidrolasa, glucohidrolasa y beta-glucosidasa.

El término "endoglucanasa" es definido aquí como una endo-1,4-(1,3,1,4)-beta-D-glucan 4-glucanohidrolasa (E.C. n.º 3.2.1.4), que cataliza la endohidrólisis de uniones 1,4-beta-D-glicosídicas en celulosa, derivados de celulosa (tal como carboximetilcelulosa e hidroxietil celulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mezclados tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal que contenga componentes celulósicos. Para objetivos de la presente invención, la actividad de la endoglucanasa es determinada usando la hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59. 257-268.

Las exo-1,4-beta-D-glucanasas incluyen tanto celobiohidrolasas como glucohidrolasas.

El término "celobiohidrolasa" es definido aquí como una 1,4-beta-D-glucan celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en celulosa, celooligosacáridos, o cualquier polímero que contenga glucosa con enlace beta-1, que libere celobiosa a partir de los extremos reductores o no reductores de la cadena. Para objetivos de la presente invención, la actividad de la celobiohidrolasa se determina según los procedimientos descritos por Lever *et al.*, 1972, *Anal. Biochem.* 47: 273-279 y por van Tilbeurgh *et al.*, 1982, *FEBS Letters*, 149: 152-156; van Tilbeurgh y Claeysens, 1985, *FEBS Letters*, 187: 283-288. En la presente invención, se empleó el método de Lever *et al.* para analizar la hidrólisis de la celulosa en forraje de maíz, mientras que el método de van Tilbeurgh *et al.* se utilizó para determinar la actividad de celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente.

El término “glucohidrolasa” es definido aquí como una 1,4-beta-D-glucano glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.74), que cataliza la hidrólisis de uniones 1,4 (enlaces O-glicosílicos) en 1,4-beta-D-glucanos para eliminar unidades de glucosa sucesivas. Para objetivos de la presente invención, la actividad de la exoglucanasa se determina según el procedimiento descrito por Himmel *et al.*, 1986, *J. Biol. Chem.* 261: 12948-12955.

El término “beta-glucosidasa” es definido aquí como una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no reductores terminales con la liberación de beta-D-glucosa. Para objetivos de la presente invención, la actividad de la beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi *et al.*, 2002, *J. Basic Microbiol.* 42: 55-66, excepto que se hayan empleado condiciones diferentes según se describe en este caso. Una unidad de actividad de beta-glucosidasa es definida como 1,0  $\mu$ mol de p-nitrofenol producido por minuto a 50°C, pH 5 de 4 mM p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato en 100 mM de citrato sódico, 0,01% de Tween-20.

#### 15 *Tratamiento de materiales lignocelulósicos*

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para procesar un material lignocelulósico para muchos productos orgánicos útiles, productos químicos y combustibles. Además del etanol, algunos productos químicos de productos básicos y especializados que se pueden producir a partir de lignocelulosa incluyen xilosa, acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgánicos (p. ej., ácido láctico), 1,3-propanodiol, butanodiol, glicerol, etilenglicol, furfúrico, polihidroxicanoatos, ácido cis, cis-mucónico y pienso (Lynd, L. R., Wyman, C. E., and Gemgross, T. U., 1999, *Bio-commodity engineering, Biotechnol. Prog.*, 15: 777-793; Philippidis, G. P., 1996, *Cellulose bioconversion technology*, en *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; y Ryu, D. D. Y., y Mandels, M., 1980, *Cellulases: biosynthesis and applications*, *Enz. Microb. Technol.*, 2: 91-102). Los beneficios de la coproducción potencial se extienden más allá de la síntesis de productos orgánicos múltiples o de carbohidrato fermentable. Los residuos ricos en lignina restantes después del tratamiento biológico se pueden convertir en productos químicos derivados de lignina, o ser usados para la producción de energía.

Métodos convencionales usados para procesar el material lignocelulósico conforme a los métodos de la presente invención son bien entendidos por los expertos en la técnica. Los métodos de la presente invención pueden ser implementados usando cualquier aparato de tratamiento de biomasa convencional configurado para funcionar conforme a la invención.

Tal aparato puede incluir un reactor discontinuo agitado, un reactor de flujo continuo agitado con ultrafiltración, un reactor continuo de columna de flujo pistón (Gusakov, A. V., y Sinityn, A. P., 1985, *Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process*, *Enz. Microb. Technol.*, 7: 346-352), un reactor de fricción (Ryu, S. K., y Lee, J. M., 1983, *Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor*, *Biotechnol. Bioeng.*, 25: 53-65), o un reactor con agitación intensiva inducida por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinityn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, *Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 56: 141-153).

Los métodos convencionales incluyen, de modo enunciativo y no limitativo, sacarificación, fermentación, hidrólisis separada y fermentación (SHF), sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), sacarificación y cofermentación simultáneas (SSCF), hidrólisis híbrida y fermentación (HHF) y conversión directa microbiana (DMC).

SHF usa pasos de procesos separados para primero hidrolizar enzimáticamente la celulosa en glucosa y luego fermentar la glucosa en etanol. En SSF, la hidrólisis enzimática de la celulosa y la fermentación de la glucosa a etanol se combina en un paso (Philippidis, G. P., 1996, *Cellulose bioconversion technology*, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). SSCF incluye la cofermentación de azúcares múltiples (Sheehan, J., and Himmel, M., 1999, *Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol*, *Biotechnol. Prog.*, 15: 817-827). HHF incluye dos pasos separados realizados en el mismo reactor pero a temperaturas diferentes, es decir, sacarificación enzimática de alta temperatura seguida de SSF a una temperatura inferior a la que la cepa de la fermentación puede tolerar. DMC combina los tres procesos (producción de celulosa, hidrólisis de celulosa y fermentación) en un paso (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., y Pretorius, I. S., 2002, *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*, *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*, 66: 506-577).

“Fermentación” o “proceso de fermentación” se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprenda un paso de fermentación. Un proceso de fermentación incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir productos de fermentación incluidos alcoholes (p. ej., arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol y xilitol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diqueto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina y treonina); gases (p. ej., metano, hidrógeno (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y monóxido de carbono (CO)). Los procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación usados en la industria alcohólica consumible (p. ej., cerveza y vino), industria láctea (p. ej., productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco.

*Métodos para producir sustancias orgánicas*

La presente invención también se refiere a métodos para producir una sustancia orgánica, que comprende: (a) sacarificar un material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas celulolíticas en presencia de un tensioactivo como mínimo donde el tensioactivo es un alcohol etoxilado secundario, donde la presencia del tensioactivo aumenta la degradación de material lignocelulósico en comparación con la ausencia del tensioactivo; (b) fermentar el material lignocelulósico sacarificado de paso (a) con uno o más microorganismos fermentativos; y (c) recuperar la sustancia orgánica de la fermentación.

La sustancia orgánica puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. En una forma de realización preferida, la sustancia orgánica es un alcohol. Se entenderá que el término "alcohol" comprende una sustancia orgánica que contiene una o más fracciones de hidróxilo. En una forma de realización más preferida, el alcohol es arabinol. En otra forma de realización más preferida, el alcohol es butanol. En otra forma de realización más preferida, el alcohol es etanol. En otra forma de realización más preferida, el alcohol es glicerol. En otra forma de realización más preferida, el alcohol es metanol. En otra forma de realización más preferida, el alcohol es 1,3-propanodiol. En otra forma de realización más preferida, el alcohol es sorbitol. En otra forma de realización más preferida, el alcohol es xilitol. Véase, por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Silveira, M. M., and Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., y Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry*, 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in situ* recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.

En otra forma de realización preferida, la sustancia orgánica es un ácido orgánico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido acético. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido acetónico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido adípico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido ascórbico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido cítrico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido 2,5-diqueto-D-glucónico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido fórmico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido fumárico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido glucárico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido glucónico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido glutárico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido 3-hidroxipropiónico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido itacónico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido láctico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido málico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido malónico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido oxálico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido propiónico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido succínico. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido xilónico. Véase, por ejemplo, Chen, R. y Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65: 435-448.

En otra forma de realización preferida, la sustancia orgánica es una cetona. Se entenderá que el término "cetona" comprende una sustancia orgánica que contiene una o más fracciones de cetona. En otra forma de realización más preferida, la cetona es acetona. Véase, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, *supra*.

En otra forma de realización preferida, la sustancia orgánica es un aminoácido. En otra forma de realización más preferida, el ácido orgánico es ácido aspártico. En otra forma de realización más preferida, el aminoácido es ácido glutámico. En otra forma de realización más preferida, el aminoácido es glicina. En otra forma de realización más preferida, el aminoácido es lisina. En otra forma de realización más preferida, el aminoácido es serina. En otra forma de realización más preferida, el aminoácido es treonina. Véase, por ejemplo, Richard, A. y Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering*, 87 (4): 501-515.

En otra forma de realización más preferida, la sustancia orgánica es un gas. En otra forma de realización más preferida, el gas es metano. En otra forma de realización más preferida, el gas es H<sub>2</sub>. En otra forma de realización más preferida, el gas es CO<sub>2</sub>. En otra forma de realización más preferida, el gas es CO. Véase, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya y K. Kiriyama, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Science and Technology* 36(6-7): 41-47; y Gunaseelan V.N. en *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.

La producción de una sustancia orgánica de material lignocelulósico típicamente requiere cuatro pasos importantes. Estos cuatro pasos son pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación. A continuación se ejemplifica un proceso para producir etanol, pero se entenderá que pueden utilizarse procesos similares para producir otras sustancias orgánicas, por ejemplo, las sustancias anteriormente descritas.



## ES 2 357 037 T3

5 *Pretratamiento.* En el paso de pretratamiento o prehidrólisis, el material lignocelulósico se calienta para descomponer la estructura de lignina y carbohidrato, solubilizar la mayor parte de la hemicelulosa y hacer la fracción de celulosa accesible a enzimas celulolíticas. El calentamiento se realiza bien directamente con vapor o en compuesto acuoso donde también puede añadirse un catalizador al material para acelerar las reacciones. Los catalizadores incluyen ácidos fuertes, tales como ácido sulfúrico y SO<sub>2</sub>, o alcali, tal como hidróxido sódico. El propósito de la fase de pretratamiento es facilitar la penetración de las enzimas y los microorganismos. La biomasa lignocelulósica también puede estar sujeta a un pretratamiento de explosión por vapor hidrotérmico (véase la Solicitud de patente estadounidense n.º 20020164730).

10 *Sacarificación.* En el paso de la hidrólisis enzimática, también conocida como sacarificación, las enzimas según se describen en el presente documento se agregan al material pretratado para convertir la fracción de celulosa en glucosa y/u otros azúcares. La sacarificación generalmente es realizada en reactores de tanque agitado o fermentadores bajo condiciones controladas de mezcla, pH, temperatura. Un paso de sacarificación puede durar hasta 120 horas. La sacarificación se puede realizar a temperaturas de aproximadamente 30°C a aproximadamente 65°C, en particular  
15 alrededor de 50°C, y a un pH en la gama entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5, especialmente alrededor de pH 4,5. Para producir glucosa que pueda metabolizarse por levadura, la hidrólisis típicamente es realizada en presencia de una beta-glucosidasa.

20 *Fermentación.* En el paso de fermentación, los azúcares, liberados del material lignocelulósico como resultado de los pasos de pretratamiento e hidrólisis enzimática, se fermentan a etanol por un organismo de fermentación, tal como levadura. La fermentación también puede efectuarse simultáneamente con la hidrólisis enzimática en el mismo vaso, nuevamente bajo condiciones controladas de mezcla, pH y temperatura. Cuando la sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente en el mismo vaso, el proceso generalmente es denominado sacarificación y fermentación simultáneas o SSF.

25 Cualquier sustrato lignocelulósico o materia prima adecuada se puede utilizar en un proceso de fermentación de la presente invención. El sustrato generalmente es seleccionado según el producto de fermentación deseado, es decir, la sustancia orgánica para ser obtenida de la fermentación, y el proceso empleado, como es bien sabido en la técnica. Ejemplos de sustratos adecuados para el uso en los métodos de la presente invención incluyen materiales  
30 con contenido de lignocelulosa, tales como madera o residuos vegetales o azúcares de bajo peso molecular DP<sub>1-3</sub> obtenidos de material lignocelulósico procesado que puede ser metabolizado por el microorganismo fermentativo, y que se pueden suministrar por adición directa al medio de fermentación.

35 Se entenderá que el término “medio de fermentación” se refiere a un medio antes de que se agregue/n el/los microorganismo/s de fermentación, tal como un medio que resulte a partir de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF).

40 El “microorganismo fermentativo” se refiere a cualquier microorganismo adecuado para el uso en un proceso de fermentación deseado. Los microorganismos fermentativos adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir azúcares, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa u oligosacáridos directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de microorganismos fermentativos incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Sacchromyces* spp., y en particular, *Sacchromyces cerevisiae*. La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, Red Star®/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, USA) FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EE. UU.), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIO (disponible de DSM Specialties).

45 En una forma de realización preferida, la levadura es *Saccharomyces* spp. En una forma de realización más preferida, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Saccharomyces distaticus*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Saccharomyces uvarum*. En otra forma de realización preferida, la levadura es una *Kluyveromyces*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*. En otra forma de realización preferida, la levadura es una *Candida*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Candida pseudotropicalis*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Candida brassicae*.  
50 En otra forma de realización preferida, la levadura es una *Clavispora*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Clavispora lusitaniae*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Clavispora opuntiae*. En otra forma de realización preferida, la levadura es un *Pachysolen*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Pachysolen tannophilus*. En otra forma de realización preferida, la levadura es un *Bretannomyces*. En otra forma de realización más preferida, la levadura es *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bio-conversion technology, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

60 Las bacterias que pueden fermentar eficazmente la glucosa a etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, *supra*).

65 Es bien sabido en la técnica que los distintos organismos anteriormente descritos también pueden ser usados para producir otras sustancias orgánicas, como se describe en el presente documento.

La clonación de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* (Chen, Z., Ho, N. W. Y., 1993, Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Biochem. Biotechnol. 39-40: 135-147; Ho, N. W. Y., Chen, Z., Brainard, A. P., 1998, Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose, Appl. Environ. Microbiol., 64: 1852-1859), o en bacterias tales como *Escherichia coli* (Beall, D. S., Ohta, K., Ingram, L. O., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*, Biotech. Bioeng. 38: 296-303), *Klebsiella oxytoca* (Ingram, L. O., Gomes, P. F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P., York, S. W., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng. 58: 204-214), y *Zymomonas mobilis* (Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., y Picataggio, S., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, Science 267: 240-243; Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C. y Picataggio, S., 1996, Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4465-4470) ha conducido a la construcción de organismos capaces de convertir hexosas y pentosas en etanol (cofermentación).

La levadura u otro microorganismo típicamente se añade a la lignocelulosa degradada o hidrolizada y la fermentación está en curso durante aproximadamente 24 a aproximadamente 96 horas, tal como aproximadamente 35 a aproximadamente 60 horas. La temperatura típicamente está entre aproximadamente 26°C a aproximadamente 40°C, en particular a aproximadamente 32°C, y a pH 3 aproximadamente a pH 6 aproximadamente, en particular pH 4-5 aproximadamente.

En formas de realización preferidas, la levadura u otro microorganismo se aplica a la lignocelulosa degradada o hidrolizada y la fermentación está en curso durante aproximadamente 24 a aproximadamente 96 horas, tal como típicamente 35-60 horas. En formas de realización preferidas, la temperatura generalmente está entre aproximadamente 26 a aproximadamente 40°C, en particular aproximadamente 32°C, y el pH generalmente es pH 3 aproximadamente a pH 6 aproximadamente, preferiblemente pH 4-5 aproximadamente. La levadura u otro microorganismo es preferiblemente aplicado en cantidades de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{12}$ , preferiblemente de aproximadamente  $10^7$  a  $10^{10}$ , especialmente aproximadamente cuenta viable  $5 \times 10^7$  por ml de caldo de fermentación. Durante una fase de producción de etanol el recuento de células de levadura debería preferiblemente estar en la gama de aproximadamente  $10^7$  a  $10^{10}$ , especialmente alrededor de aproximadamente  $2 \times 10^8$ . Una orientación adicional respecto del uso de levadura para fermentación puede encontrarse en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D. R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999).

El proceso más usado en la técnica es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) donde no hay ninguna fase de retención para la sacarificación, lo cual significa que la levadura y la enzima son agregados conjuntamente.

Para la producción de etanol, después de la fermentación la trituración se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido según el proceso de la invención puede utilizarse como, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, licores neutros potables o etanol industrial.

Un estimulador de la fermentación puede utilizarse en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos en el presente para mejorar aun más el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentativo, tal como, mejoramiento del índice y la producción de etanol. Un "estimulador de la fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentativos, en particular, la levadura. Estimuladores de fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, riboflavina y vitaminas A, B, C, D y E. Véase, por ejemplo, Alfenore *et al.*, "Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process", Springer-Verlag (2002). Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes incluidos P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn y Cu.

*Recuperación.* El alcohol se separa del material lignocelulósico fermentado y es purificado por métodos de destilación convencionales. Puede obtenerse etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 vol. % etanol, que puede ser usado como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, licores neutros potables o etanol industrial.

Para otras sustancias orgánicas, cualquier método conocido en la técnica puede ser usado incluidos, de modo enunciativo y no limitativo, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, exclusión por afinidad, hidrofóbica, por cromatoenfoco y por tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, destilación o extracción.

#### Enzimas adicionales

En los métodos de la presente invención, la/s enzima/s celulolítica/s se puede/n suplementar por una o más actividades enzimáticas adicionales para mejorar la degradación del material lignocelulósico. Las enzimas adicionales preferidas son hemicelulasas, esterasas (p. ej., lipasas, fosfolipasas y/o cutinasas), proteasas, lacasas, peroxidadas o mezclas derivadas.

En los métodos de la presente invención, la/s enzima/s adicional/es puede/n ser agregadas antes de o durante la fermentación, incluso durante o después de la propagación del microorganismo o los microorganismos de fermentación.

Las enzimas referenciadas en el presente se pueden derivar u obtener de cualquier origen adecuado, incluido el origen bacteriano, fúngico, de levadura o mamífero. El término "obtenido" significa en el presente que la enzima puede haber sido aislada de un organismo que produce naturalmente la enzima como una enzima nativa. El término "obtenido" también significa en el presente que la enzima puede haber sido producida de recombinación en un organismo huésped, donde la enzima producida de la recombinación es bien extranjera o nativa al organismo huésped o tiene una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, con uno o más aminoácidos que son deletados, sustituidos y/o insertados, es decir, una enzima producida de recombinación que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácido nucleico conocidos en la técnica. Incluido en el significado de una enzima nativa están las variantes naturales y en el significado de una enzima extranjera están las variantes obtenidas de la recombinación, tales como por mutagénesis dirigida o redistribución.

Las enzimas también pueden ser purificadas. El término "purificadas" según se utiliza en este caso comprende enzimas libres de otros componentes del organismo del cual se derivan. El término "purificadas" también incluye enzimas libres del componente del organismo nativo del cual son obtenidas. Las enzimas pueden ser purificadas, sólo con cantidades menores de otras proteínas que estén presentes. La expresión "otras proteínas" se relaciona en particular con otras enzimas. El término "purificadas" según se utiliza en este caso también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente otras proteínas y, más particularmente, otras enzimas presentes en la célula de origen de la enzima de la invención. La enzima puede ser "substancialmente pura", es decir, libre de otros componentes del organismo en el que es producida, es decir, por ejemplo, un organismo huésped para enzimas producidas por recombinación. En una forma de realización preferida, las enzimas son al menos 75% (p/p), preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 97%, incluso más preferiblemente al menos 98%, o de la forma más preferible al menos 99% pura. En otra forma de realización preferida, la enzima es 100% pura.

Las enzimas usadas en la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el uso en los procesos descritos en el presente, tales como, por ejemplo, en forma de un polvo seco o granulado, un granulado no espolvoreado, un líquido, un líquido estabilizado o una enzima protegida. Los granulados pueden ser producidos, por ejemplo, como se describe en las patentes estadounidenses nos. 4.106.991 y 4.661.452, y pueden opcionalmente ser revestidas por procesos conocidos en la técnica. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico según procesos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el proceso descrito en EP 238.216.

### *Hemicelulasas*

La hidrólisis enzimática de hemicelulosas puede realizarse por una amplia variedad de hongos y bacterias. De igual modo que la degradación de celulosa, la hidrólisis de hemicelulosa requiere acción coordinada de muchas enzimas. Las hemicelulasas se pueden colocar en tres categorías generales: las enzimas endo activas que atacan los enlaces internos en la cadena polisacárida, las enzimas exo activas que actúan de manera consecutiva desde el extremo reductor o no reductor de la cadena polisacárida, y las enzimas accesorias, acetilsterasas y esterases que hidrolizan enlaces de glucósido de lignina, tales como esterasa de ácido cumárico y esterasa de ácido ferúlico (Wong, K.K.Y., Tan, L. U. L., y Saddler, J. N., 1988, Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications, *Microbiol. Rev.* 52: 305-317; Tenkanen, M. y Poutanen, K., 1992, Significance of esterases in the degradation of xylans, in *Xylans and Xylanases*, Visser, J., Beldman, G., Kuster-van Someren, M. A. y Voragen, A. G. J., eds., Elsevier, New York, NY, 203-212; Coughlan, M. P. y Hazlewood, G. P., 1993, *Hemicellulose and hemicellulases*, Portland, Londres, Reino Unido; Brigham, J. S., Adney, W. S. y Himmel, M. E., 1996, *Hemicellulases: Diversity and applications*, en *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 119-141).

Las hemicelulasas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, acetil xilano esterasa, glucuronidasas, endo-galactanasa, mananasas, endo o exo arabinasas, exo-galactansas y sus mezclas derivadas. Ejemplos de hemicelulasas endo-activas y enzimas auxiliares incluyen endoarabinanasa, endoarabinogalactanasa, endoglucanasa, endomananasa, endoxilanasa y feraxan endoxilanasa. Ejemplos de hemicelulasas exo activas y enzimas auxiliares incluyen  $\alpha$ -L-arabinosidasa,  $\beta$ -L-arabinosidasa,  $\alpha$ -1,2-L-fucosidasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\beta$ -D-glucuronidasa,  $\beta$ -D-manosidasa,  $\beta$ -D-xilosidasa, exoglucosidasa, exocelobiohidrolasa, exomanobiohidrolasa, exomananasa, exoxilanasa, xilano  $\alpha$ -glucuronidasa y coniferina  $\beta$ -glucosidasa. Ejemplos de esterases incluyen acetil esterases (acetil-galactano esterasa, acetilmanano esterasa y acetilxilano esterasa) y arilesterasas (esterasa de ácido cumárico y esterasa de ácido ferúlico).

Preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa exo activa, y más preferiblemente, una hemicelulasa exo activa que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7. Un ejemplo de una hemicelulasa adecuada para el uso en la presente invención incluye VISCOZYME™ (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca). La hemicelulasa se añade en una cantidad eficaz de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 5,0% en peso de sólidos, más preferiblemente de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 4,0% en peso de sólidos, y de la forma más preferible de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 2,0% en peso de sólidos.

## ES 2 357 037 T3

Una xilanasa (E.C. 3.2.1.8) se puede obtener de cualquier fuente adecuada, incluidos organismos bacterianos y fúngicos, tales como *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Thermomyces* y *Bacillus*. Preparaciones preferidas disponibles comercialmente que comprenden xilanasa incluyen SHEARZYME<sup>®</sup>, BIOFEED WHEAT<sup>®</sup>, BIOFEED Plus<sup>®</sup> L, CELLUCLAST<sup>®</sup>, ULTRAFLO<sup>®</sup>, VISCOZYME<sup>®</sup>, PEN-  
5 TOPAN MONO<sup>®</sup> BG, y PULPZYME<sup>®</sup> HC (Novozymes A/S); y LAMINEX<sup>®</sup> y SPEZYME<sup>®</sup> CP (Genencor Int.).

### Esterasas

10 Las esterasas que se pueden usar para bioconversión de lignocelulosa incluyen acetil esterasas tales como acetilgalactano esterasa, acetilmanano esterasa y acetilxilano esterasa, y esterasas que hidrolizan enlaces glucosídicos de lignina, tales como esterasa de ácido cumárico y esterasa de ácido ferúlico.

Según se utiliza en este caso, una “esterasa” conocida también como una hidrolasa de éster carboxílico, se refiere a enzimas que actúan en enlaces estéricos, e incluye enzimas clasificadas en EC 3.1.1 Hidrolasas del éster carboxílico según Nomenclatura Enzimática (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, California, con  
15 Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) y Suplemento 5, en Eur. J. Biochem. 223: 1-5, 1994; Eur. J. Biochem. 232: 1-6, 1995; Eur. J. Biochem. 237: 1-5, 1996; Eur. J. Biochem. 250: 1-6, 1997, y Eur. J. Biochem. 264: 610-650, 1999; respectivamente). Ejemplos no limitativos de esterasas incluyen  
20 arilesterasa, triacilglicerol-lipasa, acetilesterasa, acetilcolinesterasa, colinesterasa, tropinesterasa, pectinesterasa, esterol-esterasa, clorofilasa, L-arabinonolactonasa, gluconolactonasa, uronolactonasa, tanasa, de retinil-palmitato esterasa, hidroxibutirato-dímero hidrolasa, acilglicerol lipasa, 3-oxoadipato enol-lactonasa, 1,4-lactonasa, galactolipasa, 4-piridoxolactonasa, acilcarnitina hidrolasa, aminoacil-ARNt hidrolasa, D-arabinonolactonasa, 6-fosfogluconolactonasa, fosfolipasa A1, 6-acetilglucosa desacetilasa, lipoproteína-lipasa, dihidrocoumarina lipasa, limonin-D-anillo-lactonasa,  
25 esteroide-lactonasa, triacetato-lactonasa, actinomicina lactonasa, orselinato-depsido hidrolasa, cefalosporina-C deacetilasa, clorogenato hidrolasa, alfa-aminoácido esterasa, 4-metiloxaloacetato esterasa, carboximetilenobutenolidasa, desoxilimonato A-anillo-lactonasa, 2-acetil-1-alcilglicerofosfocolina esterasa, fusarinina-C ornitinesterasa, sinapina esterasa, sinapina esterasa, hidrolasa de éster de cera, forbol-diéster hidrolasa, fosfatidilinositol desacilasa, sialato O-acetilesterasa, acetoxibutirilbitiofeno desacetilasa, acetilsalicilato desacetilasa, metilumbeliferil-acetato desacetilasa,  
30 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa, N-acetilgalactosaminoglicano desacetilasa, hormona juvenil esterasa, bis(2-etilhexil)ftalato esterasa, proteína-glutamato metilesterasa, 11-cis-retinil-palmitato hidrolasa, todo-trans-retinil-palmitato hidrolasa, L-ramnono-1,4-lactonasa, 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno desacetilasa, sintasa de acil-etil-éster-graso, xilono-1,4-lactonasa, n-acetilglucosaminilfosfatidilinositol desacetilasa, cetraxato bencilsterasa, acetalalquilglicerol acetilhidrolasa y acetilxilano esterasa.

35 Las esterasas preferidas para el uso en la presente invención son enzimas lipolíticas, tales como, lipasas (clasificadas como EC 3.1.1.3, EC 3.1.1.23, y/o EC 3.1.1.26) y fosfolipasas (clasificadas como EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32, incluidas lisofosfolipasas clasificadas como EC 3.1.1.5). Otras esterasas preferidas son cutinasas (clasificadas como EC 3.1.1.74).

40 La esterasa se puede agregar en una cantidad eficaz para obtener el beneficio deseado para mejorar el rendimiento del microorganismo fermentativo, por ejemplo, para cambiar la composición/concentración de lípido dentro y/o fuera del microorganismo fermentativo o en la membrana celular del microorganismo fermentativo, para generar una mejora en el movimiento de solutos dentro y/o fuera de los microorganismos fermentativos durante la fermentación y/o  
45 para proporcionar fuentes de energía más metabolizables (tales como, por ejemplo, por conversión de los componentes, tales como aceite del sustrato de maíz, en componentes útiles para el microorganismo fermentativo, por ejemplo, ácidos grasos insaturados y glicerol), para aumentar el rendimiento del etanol. Ejemplos de cantidades eficaces de esterasa son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 400 UL/g DS (del inglés Dry Solids = Sólidos Secos). Preferiblemente, la esterasa se usa en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 UL/g DS, más  
50 preferiblemente aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 UL/g DS, e incluso más preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 20 UL/g DS. Una optimización adicional de la cantidad de esterasa puede obtenerse en adelante usando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

55 Una Unidad Lipásica (UL) es la cantidad de enzima que libera 1,0  $\mu$ mol de ácido graso titulable por minuto con tributirina como sustrato y goma arábica como un emulsionante a 30EC, pH 7,0 (tampón fosfato).

En una forma de realización preferida, la esterasa es una enzima lipolítica, más preferiblemente, una lipasa. Según se utiliza en este caso, una “enzima lipolítica” se refiere a lipasas y fosfolipasas (incluidas las lisofosfolipasas). La enzima lipolítica es preferiblemente de origen microbiano, en particular de origen bacteriano, fúngico o de levadura.  
60 La enzima lipolítica usada se puede derivar de cualquier fuente, incluidas, por ejemplo, una cepa de *Absidia*, en particular *Absidia blakesleena* y *Absidia corymbifera*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aeromonas*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Altemaria brassiciola*, una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Asoergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aureobasidium*, en particular *Aureobasidium pullulans*, una cepa de *Bacillus*, en particular *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*, una cepa de *Beauveria*,  
65 una cepa de *Brochothrix*, en particular *Brochothrix thermosohata*, una cepa de *Candida*, en particular *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*), *Candida paratipolytica* y *Candida antarctica*, una cepa de *Chromobacter*, en particular *Chromobacter viscosum*, una cepa de *Coprinus*, en particular *Coprinus cinerius*, una cepa de *Fusarium*, en particular

*Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum* y *Fusarium venenatum*, una cepa de *Geotricum*, en particular *Geotricum penicillatum*, una cepa de *Hansenula*, en particular *Hansenula anomala*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola brevispora*, *Humicola brevis* var. *thermoidea* y *Humicola insolens*, una cepa de *Hyphozyma*, una cepa de *Lactobacillus*, en particular *Lactobacillus curvatus*, una cepa de *Metarhizium*, una cepa de *Mucor*, una cepa de *Paecilomyces*, una cepa de *Penicillium*, en particular *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum* y *Penicillium expansum*, una cepa de *Pseudomonas* en particular *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia* (sin. *Burkholderia cepacia*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas mephitica lipolytica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas plantari*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, y *Pseudomonas wisconsinensis*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Rhizomucor*, en particular *Rhizomucor miehei*, una cepa de *Rhizopus*, en particular *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus microsporus* y *Rhizopus nodosus*, una cepa de *Rhodospiridium*, en particular *Rhodospiridium toruloides*, una cepa de *Rhodotorula*, en particular *Rhodotorula glutinis*, una cepa de *Sporobolomyces*, en particular *Sporobolomyces shibatanus*, una cepa de *Thermomyces*, en particular *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente *Humicola lanuginosa*), una cepa de *Thiarosporella*, en particular *Thiarosporella phaseolina*, una cepa de *Trichoderma*, en particular, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei*, y/o una cepa de *Verticillium*.

En una forma de realización preferida, la enzima lipolítica se deriva de una cepa de *Aspergillus*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Chromobacter*, *Fusarium*, *Humicola*, *Hyphozyma*, *Pseudomonas*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* o *Thermomyces*.

En formas de realización más preferidas, la enzima lipolítica es una lipasa. Las lipasas pueden ser aplicadas en la presente por su capacidad para modificar la estructura y la composición de grasas y aceites de triglicérido en los medios de fermentación (incluida la levadura de fermentación), por ejemplo, que resulten a partir de un sustrato de maíz. Las lipasas catalizan diferentes tipos de conversiones de triglicérido, tales como hidrólisis, esterificación y transesterificación. Las lipasas adecuadas incluyen lipasas ácidas, neutras y básicas, como se sabe bien en la técnica, aunque las lipasas ácidas (tales como, por ejemplo, la lipasa G AMANO 50, disponible de Amano) parecen ser más eficaces en concentraciones inferiores de lipasa en comparación con las lipasas básicas o neutras. Las lipasas preferidas para el uso en la presente invención incluyen lipasa de *Candida antarctica* y lipasa de *Candida cylindracea*. Las lipasas más preferidas son lipasas purificadas tales como lipasa de *Candida antarctica* (lipasa A), lipasa de *Candida antarctica* (lipasa B), lipasa de *Candida cylindracea* y lipasa de *Penicillium camembertii*.

La lipasa puede ser la descrita en EP 258.068-A o puede ser una variante de lipasa tal como una variante descrita en WO 00/60063 o WO 00/32758. Las lipasas comerciales preferidas incluyen LECITASE™, LIPOLASE™ y LIPEXT™ (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca) y G AMANO™ 50 (disponible de Amano).

Las lipasas son preferiblemente agregadas en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 LU/g DS, preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 10 LU/g DS y más preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 5 LU/g DS.

En otra forma de realización preferida de la presente invención, la esterasa es una cutinasa. Las cutinasas son enzimas que son capaces de degradar cutina. La cutinasa se puede derivar de cualquier fuente. En una forma de realización preferida, la cutinasa se deriva de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambucium*, una cepa de *Helminthosporium*, en particular *Helminthosporium sativum*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola insolens*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina* o *Pseudomonas putida*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Streptomyces*, en particular *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular *Ulocladium consortiale*. En una forma de realización más preferida la cutinasa se deriva de una cepa de *Humicola insolens*, en particular la cepa de *Humicola insolens* DSM 1800. La cutinasa de *Humicola insolens* está descrita en WO 96/13580. La cutinasa puede ser una variante tal como una de las variantes descritas en WO 00/34450 y WO 01/92502. Las variantes de cutinasa preferidas incluyen variantes catalogadas en el ejemplo 2 de WO 01/92502. Una cantidad eficaz de cutinasa es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 400 LU/g DS, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 LU/g DS, y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 LU/g DS. Una optimización adicional de la cantidad de cutinasa puede de aquí en adelante ser obtenida usando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

En otra forma de realización preferida, la esterasa es una fosfolipasa. Como se utiliza en este caso, el término “fosfolipasa” es una enzima que tiene actividad hacia los fosfolípidos, por ejemplo, actividad hidrolítica. Los fosfolípidos, tales como lecitina o fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en una posición externa (sn-1) y del medio (sn-2) y esterificado con ácido fosfórico en la tercera posición. El ácido fosfórico se puede esterificar a un alcohol amino. Pueden distinguirse diferentes tipos de actividad fosfolipásica, incluidas las fosfolipasas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> que hidrolizan un grupo acilo graso (en la posición sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que hidroliza el grupo acilo graso restante en lisofosfolípido. La fosfolipasa C y la fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacilglicerol o ácido fosfatídico respectivamente.

El término “fosfolipasa” incluye enzimas con actividad fosfolipásica, por ejemplo, fosfolipasa A (A<sub>1</sub> o A<sub>2</sub>), actividad de fosfolipasa B, actividad de fosfolipasa C, o actividad de fosfolipasa D. El término “fosfolipasa A” según

se utiliza en este caso tiene la intención de comprender una enzima con fosfolipasa A<sub>1</sub> y/o actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>. La actividad fosfolipásica puede ser proporcionada por enzimas que tienen otras actividades también, tales como, por ejemplo, una lipasa con actividad fosfolipásica. La actividad fosfolipásica puede, por ejemplo, ser de una lipasa con actividad fosfolipásica lateral. En otras formas de realización, la actividad enzimática de la fosfolipasa está provista por una enzima que tiene esencialmente actividad fosfolipásica solamente y donde la actividad enzimática de la fosfolipasa no es una actividad secundaria.

La fosfolipasa puede ser de cualquier origen, por ejemplo, de origen animal (p. ej., mamífero, por ejemplo, páncreas porcino o bovino), o veneno de serpiente o veneno de abeja. Alternativamente, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo, de hongos filamentosos, levadura o bacterias, tal como *Aspergillus*, por ejemplo, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. niger*, o *A. oryzae*, *Dictyostelium*, por ejemplo, *D. discoideum*; *Fusarium*, por ejemplo, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, o *F. venenatum*; *Mucor*, por ejemplo, *M. javanicus*, *M. mucedo*, o *M. subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo, *R. pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*, *Sclerotinia*, por ejemplo, *S. libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo, *B. megaterium*, o *B. subtilis*; *Citrobacter*, por ejemplo, *C. freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo, *E. aerogenes* o *E. cloacae*; *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo, *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo, *K. pneumoniae*; *Proteus*, por ejemplo, *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo, *P. stuartii*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *S. violeceoruber*, o *Yersinia*, por ejemplo, *Y. enterocolitica*.

Las fosfolipasas comerciales preferidas incluyen LECITASE™ y LECITASE™ ULTRA (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

Una cantidad eficaz de fosfolipasa es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 400 LU/g DS, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 LU/g DS, y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 LU/g DS. Una optimización adicional de la cantidad de fosfolipasa puede en adelante obtenerse usando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

### 30 Proteasas

En otra forma de realización preferida de la invención, al menos un tensioactivo y al menos una enzima generadora de carbohidrato se usa en combinación con al menos una proteasa. La proteasa puede ser utilizada, por ejemplo, para digerir proteína para producir amino nitrógeno libre (FAN -del inglés Free Amino-Nitrogen). Tales aminoácidos libres funcionan como nutrientes para la levadura, aumentando así el crecimiento de la levadura y, consecuentemente, la producción de etanol.

El microorganismo fermentativo para el uso en un proceso de fermentación se puede producir mediante la propagación del microorganismo fermentativo en presencia de al menos una proteasa. Aunque sin limitarse a ninguna teoría de operación, se cree que la propagación del microorganismo fermentativo con una cantidad eficaz de al menos una proteasa reduce el tiempo de lapso del microorganismo fermentativo cuando el microorganismo fermentativo es posteriormente usado en un proceso de fermentación en comparación con un microorganismo fermentativo que fue propagado bajo las mismas condiciones sin la adición de la proteasa. Se cree que la acción de la proteasa en el proceso de propagación genera directa o indirectamente la supresión o la expresión de genes que son perjudiciales o beneficiosos, respectivamente, para el microorganismo fermentativo durante la fermentación, disminuyendo así el tiempo de lapso y dando como resultado un ciclo de fermentación más rápida.

Las proteasas se conocen bien en la técnica y se refieren a enzimas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos. Las proteasas adecuadas incluyen proteasas bacterianas y fúngicas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7. Las proteasas fúngicas de ácido adecuadas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Especialmente contempladas están las proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (véase, por ejemplo, Koaze *et al.*, 1964, Agr. Biol. Chem. Japan 28: 216), *Aspergillus saitoi* (véase, por ejemplo, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japan 28: 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida *et al.*, 1977, Agric. Biol. Chem. 42: 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

Las proteasas bacterianas, que no son proteasas ácidas, incluyen los productos disponibles comercialmente ALCALASE™ y NEUTRASE™ (disponibles de Novozymes A/S). Otras proteasas incluyen GC106 de Genencor Int, Inc., EE. UU. y NOVOZYM™ 50006 de Novozymes A/S.

Preferiblemente, la proteasa es una proteasa de ácido aspártico, como se describe, por ejemplo, en Handbook of Proteolytic Enzymes, Editado por A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, capítulo 270). Ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellas descritas por Berka *et al.*, 1990, Gene 96: 313; Berka *et al.*, 1993, Gene 125: 195-198; y Gomi *et al.*, 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

## ES 2 357 037 T3

### *Peroxidasas*

Otros compuestos que poseen actividad de peroxidasa pueden ser cualquier peroxidasa (EC 1.11.1.7), o cualquier fragmento que tenga actividad de peroxidasa derivada del mismo, que muestre actividad de peroxidasa.

5

Preferiblemente, la peroxidasa es producida por plantas (p. ej., peroxidasa de alfalfa o semilla de soja) o microorganismos tales como hongos o bacterias.

Algunos hongos preferidos incluyen cepas pertenecientes a la subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Hyphomycetes*, por ejemplo, *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Verticillum*, *Arthromyces*, *Caldariomyces*, *Ulocladium*, *Embellisia*, *Cladosporium*, o *Dreschlera*, en particular *Fusarium oxysporum* (DSM 2672), *Humicola insolens*, *Trichoderma reesii*, *Myrothecium verrucaria* (IFO 6113), *Verticillum alboatrum*, *Verticillum dahliae*, *Arthromyces ramosus* (FERM P-7754), *Caldariomyces fumago*, *Ulocladium chartarum*, *Embellisia alli*, o *Dreschlera halodes*.

Otros hongos preferidos incluyen cepas de la subdivisión *Basidiomycotina*, clase *Basidiomycetes*, por ejemplo., *Coprinus*, *Phanerochaete*, *Coriolus*, o *Trametes*, en particular *Coprinus cinereus* f. *microsporus* (IFO 8371), *Coprinus macrorhizus*, *Phanerochaete chrysosporium* (e.g. NA-12), o *Trametes* (previamente llamada *Polyporus*), por ejemplo, *T. versicolor* (por ejemplo PR4 28-A).

Otros hongos preferidos incluyen cepas de la subdivisión *Zygomycotina*, clase *Mycoraceae*, por ejemplo, *Rhizopus* o *Mucor*, en particular *Mucor hiemalis*.

Algunas bacterias preferidas incluyen cepas del orden *Actinomycetales*, por ejemplo *Streptomyces spheroides* (ATCC 23965), *Streptomyces thermoviolaceus* (IFO 12382), o *Streptoverticillum verticillium* ssp. *verticillium*.

25

Otras bacterias preferidas incluyen cepas *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodomonas palustri*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas purrocinia* (ATCC 15958), *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-11) y *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus pumilus* (ATCC 12905) y *Bacillus stearothermophilus*.

Otras bacterias preferidas incluyen cepas de *Mixococcus*, por ejemplo, *M. virescens*.

La peroxidasa también puede ser una que se produzca por un método que comprenda cultivar una célula huésped transformada con un vector de ADN recombinante que lleve una secuencia de ADN que codifique la peroxidasa al igual que secuencias de ADN para la expresión de la secuencia de ADN que codifique la peroxidasa, en un medio de cultivo bajo condiciones que permitan la expresión de la peroxidasa y la recuperación de la peroxidasa del cultivo.

35

En una forma de realización preferida, una peroxidasa producida por recombinación es una peroxidasa derivada de una *Coprinus* sp., en particular *C. macrorhizus* o *C. cinereus* según WO 92/16634.

En la presente invención, los compuestos que poseen actividad de peroxidasa comprenden enzimas peroxidasa y fragmentos activos de peroxidasa derivados de citocromos, hemoglobina o enzimas peroxidasa.

Una unidad de peroxidasa (POXU) es la cantidad de enzima que bajo las siguientes condiciones cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno por minuto a 30°C en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0, peróxido de hidrógeno 0,88 mM y 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)(ABTS) 1,67 mM. La reacción se sigue durante 60 segundos (15 segundos después de mezclar) por el cambio en absorbencia a 418 nm, que debería estar en la gama de 0,15 a 0,30. Para el cálculo de la actividad, se utiliza un coeficiente de absorción de ABTS oxidado de 36  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  y una estequiometría de un  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  convertido por dos  $\mu\text{mol}$  de ABTS oxidado.

50

### *Lacasas*

En la presente invención, las lacasas y las enzimas relacionadas con la lacasa comprenden cualquier enzima lacasa clasificada como EC 1.10.3.2, cualquier enzima oxidasa de catecol clasificada como EC 1.10.3.1, cualquier enzima oxidasa de bilirrubina clasificada como EC 1.3.3.5 o cualquier enzima de monofenol-monooxigenasa clasificada como EC 1.14.18.1.

55

Las enzimas mencionadas más arriba pueden ser microbianas, es decir, obtenidas de bacterias u hongos (incluidos hongos filamentosos y levaduras), o se pueden derivar de plantas.

60

Ejemplos adecuados de hongos incluyen una lacasa obtenida de una cepa de *Aspergillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*, *Rhizooctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinereus*, *C. comatus*, *C. friesii* y *C. plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana*, *Panaeolus*, por ejemplo, *P. papilionaceus*, *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*, *Schytalidium*, por ejemplo, *S. thermophilum*, *Polyporus*, por ejemplo, *P. pinsitus*, *Pycnoporus*, por ejemplo, *P. cinnabarinus*, *Phlebia*, por ejemplo, *P. radita* (WO 92/01046) o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (JP 2-238885).

65

## ES 2 357 037 T3

Ejemplos adecuados de bacterias incluyen una lacasa obtenida de una cepa de *Bacillus*.

Se prefiere una lacasa obtenida de *Coprinus*, *Myceliophthora*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Scytalidium* o *Rhizoctonia*; en particular una lacasa obtenida de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Polyporus pinsitus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Scytalidium thermophilum*, o *Rhizoctonia solani*.

Lacasas disponibles comercialmente son NS51001 (una lacasa de *Polyporus pinsitus*, disponible de Novozymes A/S, Dinamarca) y NS51002 (una lacasa de *Myceliophthora thermophila*, disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

La lacasa o la enzima relacionada a la lacasa también puede ser una que se produzca por un método que comprenda cultivar una célula huésped transformada con un vector de ADN recombinante que lleve una secuencia de ADN que codifique la lacasa al igual que secuencias de ADN para la expresión de la secuencia de ADN que codifique la lacasa, en un medio de cultivo bajo condiciones que permitan la expresión de la enzima lacasa y la recuperación de la lacasa del cultivo.

La actividad de lacasa (LACU) se determina a partir de la oxidación de siringaldazina bajo condiciones aeróbicas a pH 5,5. El color violeta producido se mide con fotómetro a 530 nm. Las condiciones analíticas son 19 mM de siringaldazina, 23 mM de tampón de acetato, pH 5,5, 30°C, tiempo de reacción de 1 minuto. Una unidad de lacasa (LACU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0  $\mu\text{mol}$  de siringaldazina por minuto bajo las condiciones anteriores.

La actividad de lacasa (LAMU) se determina a partir de la oxidación de siringaldazina bajo condiciones aeróbicas a pH 7,5. El color violeta producido se fotometrea a 530 nm. Las condiciones analíticas son 19 mM siringaldazina, 23 mM Tris/maleato pH 7,5, 30°C, tiempo de reacción de 1 minuto. Una unidad de lacasa (LAMU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0  $\mu\text{mol}$  siringaldazina por minuto bajo las condiciones anteriores.

La presente invención es descrita además por los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse como limitadores del ámbito de la invención.

### Ejemplos

#### Materiales

Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

#### Cepas

RutC30 de *Trichoderma reesei* (ATCC 56765; Montencourt y Eveleigh, 1979, Adv. Chem. Ser. 181: 289-301), que fue derivada de Qm6A de *Trichoderma reesei* (ATCC 13631; Mandels y Reese, 1957, J. Bacteriol. 73: 269-278), fue usada como un huésped para la expresión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Células TOP10 de la cepa de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, California) y células competentes de electroporación de *Epicurian coli* SURE (Stratagene, La Jolla, CA) fueron usadas para propagación de plásmidos.

La cepa JaL250 de *Aspergillus oryzae* (WO 99/61651) fue usada para la expresión de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*. PaHa34 de *Aspergillus fumigatus* fue usada como la fuente de la beta-glucosidasa de la familia GH3A.

#### Medios y soluciones de tampón

El medio YP fue compuesto por litro de 10 g de extracto de levadura y 20 g de bactopectona.

Las placas de la selección COVE fueron compuestas por litro de 342,3 g de sacarosa, 20 ml de solución salina COVE, 10 mM acetamida, 15 mM CsCl<sub>2</sub> y 25 g de agar Noble.

Las placas COVE2 fueron compuestas por litro de 30 g de sacarosa, 20 ml de solución salina COVE, 10 mM acetamida y 25 g de agar Noble.

La solución salina fue compuesta por litro de 26 g de KCl, 26 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 76 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 50 ml de solución de metales traza COVE.

La solución de metales de traza COVE fue compuesta por litro de 0,04 g de NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 0,4 g de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 1,2 g de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,7 g de MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0,8 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O y 10 g de ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O.



## ES 2 357 037 T3

Los medios inductores de celulosa fueron compuestos por litro de 20 g de fibras de celulosa Arbocel B800-natural (J. Rettenmaier USA LP, Schoolcraft, Michigan), 10 g de sólidos de maíz fermentado (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1,45 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,08 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,28 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0,42 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,42 ml de solución de metales traza de *Trichoderma reesei* y 2 gotas de ácido plurónico; pH a 6,0 con 10 N NaOH.

5

La solución de metales traza *Trichoderma reesei* fue compuesta por litro de 216 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 58 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 27 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 10 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2,4 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 336 g de ácido cítrico.

El tampón PEG fue compuesto por litro de 500 g de PEG 4000 (BDH, Poole, Inglaterra), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  y 10 mM tris-HCl pH 7,5 (esterilización con filtro).

STC fue compuesto por litro de 1 M de sorbitol, 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 10 mM de tris-HCl pH 7,5 (esterilización con filtro).

El medio YPD fue compuesto por litro de 10 g de extracto de levadura, 20 g de bacto tripton y 40 ml de glucosa al 50%.

El medio de selección de levadura fue compuesto por litro de 6,7 g de base nitrogenada de levadura, 0,8 g de mezcla de suplemento completa (CSM, Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA; carente de uracilo y con 40 mg/ml de adenina), 5 g de ácidos de casamino (sin aminoácidos), 100 ml de 0,5 M de succinato pH 5,0, 40 ml de glucosa al 50%, 1 ml de 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ , 50 mg de ampicilina y 25 mg de cloranfenicol.

El medio de placa de selección de levadura fue compuesto por litro de medio de selección de levadura suplementado con 20 g de bacto agar y 150 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucopiranosido (X-Glc, INALCO SPA, Milán, Italia) pero careciendo ambos de ampicilina y cloranfenicol.

El medio de dextrosa de patata fue compuesto por litro de 39 gramos de dextrosa de patata (Difco).

Las placas PDA fueron compuestas por litro de 39 gramos de agar de dextrosa de patata.

El medio MDU2BP fue compuesto por litro de 45 g de maltosa, 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de NaCl, 2 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 12 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 g de extracto de levadura, 2 g de urea y 0,5 ml de solución de metales traza AMG, pH a 5,0.

La solución de metales traza AMG fue compuesta por litro de 14,3 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 13,8 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8,5 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 3 g de ácido cítrico.

El medio CIM fue compuesto por litro de 20 g de celulosa, 10 g de sólidos de maíz fermentado, 1,45 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,08 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,28 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0,42 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , y 0,42 ml de solución de metales traza, pH a 6,0.

La solución de metales traza fue compuesta por litro de 41,2 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 11,6 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,4 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,0 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,48 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 67,2 mg de ácido cítrico.

### *Ensayo de actividad de beta-glucosidasa*

45

La actividad de beta-glucosidasa fue determinada a temperatura ambiente en 25  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes crudos de cultivo, diluido 1:10 en 50 mM de succinato pH 5,0, usando 200  $\mu\text{l}$  de 0,5 mg/ml de P-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido (pnpBDG) como sustrato en 50 mM de succinato pH 5,0. Después de 15 minutos de incubación, la reacción fue detenida añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de 1 M Tris-HCl pH 8,0 y la absorbencia fue leída espectrofotométricamente a 405 nm. La beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novozyme 188, Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) fue usada como un estándar enzimático.

### *Ensayo de actividad de endoglucanasa*

55

La actividad específica de endoglucanasas hacia carboximetilcelulosa (CMC, 5 mg/ml) fue determinada midiendo el nivel inicial de hidrólisis en la gama de aumento lineal de la concentración de azúcar de reducción (RS del inglés Reduction Sugar) con el paso del tiempo en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 a 50°C. La hidrólisis se efectúa sin agitación en presencia de 0,5 mg/ml de BSA. La actividad específica fue expresada en unidades internacionales (IU -del inglés International Unit-) por mg de proteína. Una IU es definida como el  $\mu\text{mol}$  de enlaces glicosídicos hidrolizados en un minuto durante el periodo inicial de la hidrólisis. Las enzimas fueron diluidas para dar una relación lineal entre la concentración enzimática y la actividad medida.

La carboximetilcelulosa (tipo 7L2, Hercules Inc., Wilmington, DE) con grado medio de sustitución (DS) de 0,7. Una solución de 6,25 mg/ml de CMC en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 fue preparada añadiendo lentamente CMC al tampón enérgicamente agitado, seguido de calentamiento a aproximadamente 60°C bajo agitación continua hasta la disolución completa.

65

## ES 2 357 037 T3

### Ensayo de actividad de endoglucanasa

La actividad de celobiohidrolasa fue determinada según el procedimiento descrito por Deshpande *et al.* (Deshpande, M.V., Eriksson, K.-E., Pettersson, L.G., 1984, An assay for selective determination of exo-1,4- $\beta$ -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes, *Anal. Biochem.* 138: 481-487), que fue modificado a un formato de microplaca de 96 pocillos. La concentración de p-nitrofenol (PNP) producida de 2,5 mM de P-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosido (PNPC, Cat. # 5754, Sigma, St. Louis, MO) fue medido espectrofotométricamente a 405 nm ( $A_{405}$ ) después de 30 minutos de hidrólisis en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 a 40°C. Antes de la hidrólisis, las enzimas fueron diluidas en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 para dar menos de 8% de conversión de PNPC en las condiciones especificadas.

### Enzimas

Celluclast 1,5 L se obtuvo de Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca. La concentración de proteína en las muestras de celulosa fue determinada por el ensayo de microplaca de BCA como se describe en las Instrucciones para el equipo de reactivos del ensayo de proteínas PCS (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Antes de determinar la concentración, algunas muestras fueron desaladas pasando a través de columnas Bio Spin 6 (BioRad Laboratories, Hercules, CA) según las instrucciones del fabricante.

Antes de los experimentos de hidrólisis, la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae* según WO 02/095014), la beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatis* (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) y la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) fueron desaladas e intercambiadas en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 tampón, usando filtro centrífugo Centricon Plus-20 con membrana Biomax-5 (5000 NMWL; Millipore, Bedford, MA).

Las diluciones enzimáticas fueron preparadas nuevas antes de cada experimento a partir de soluciones de enzima de materia prima, que fueron almacenadas a -20°C.

### Ejemplo 1

#### Construcción del vector de expresión pAllo1

El vector de expresión pAllo1 fue construido modificando pBANE6 (Patente estadounidense 6.461.837), que comprende un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae* (promotor NA2-tpi), secuencia del terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (terminador AMG) y gen de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* (*amdS*). La modificación de pBANE6 fue realizada eliminando primero tres sitios de restricción NcoI en las posiciones 2051, 2722 y 3397 bp del marcador de selección *amdS* por mutagénesis dirigida. Todos los cambios fueron diseñados para ser "silenciosos" dejando la secuencia de proteína real del producto genético *amdS* sin modificaciones. La eliminación de estos tres sitios fue realizada simultáneamente con un equipo de mutagénesis dirigida GeneEditor (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante usando los siguientes cebadores (el nucleótido subrayado representa la base cambiada):

AMDS3NcoMut (2050):

5'-GTGCCCCATGATACGCCTCCGG-3' (SEC ID N.º 1)

AMDS2NcoMut (2721):

5'-GAGTCGTATTTCCAAGGCTCCTGACC-3' (SEC ID N.º 2)

AMDS1 NcoMut (3396):

5'-GGAGGCCATGAAGTGGACCAACGG-3' (SEC ID N.º 3)

Luego se sometió a mutagénesis dirigida un plásmido que comprende los tres cambios de la secuencia previstos, usando un equipo de mutagénesis QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA), para eliminar el sitio de restricción NcoI al final del terminador AMG en la posición 1643. Los siguientes cebadores (el nucleótido subrayado representa la base cambiada) fueron usados para la mutagénesis:

Cebador superior para mutagenizar la secuencia del terminador AMG:

5'-CACCGTGAAAGCCATGCTCTTTCCTTCGTGTAGAAGACCAGACAG-3' (SEC ID N.º 4)

## ES 2 357 037 T3

Cebador inferior para mutagenizar la secuencia del terminador AMG:

5'-CTGGTCTTCTACACGAAGGAAAGAGCATGGCTTTCACGGTGTCTG-3' (SEC ID N.º 5)

5

El último paso en la modificación de pBANE6 fue la adición de un nuevo sitio de restricción *NcoI* al principio del poliligador usando un equipo de mutagénesis QuickChange y los siguientes cebadores (los nucleótidos subrayados representan las bases cambiadas) para producir pAlLo1 (figura 3).

10 Cebador superior para mutagenizar el promotor NA2-tpi:

5'-CTATATACACAACTGGATTTACCATTGGGCCCGCGGCCGCAGATC-3' (SEC ID N.º 6)

15 Cebador inferior para mutagenizar el promotor NA2-tpi:

5'-GATCTGCGGCCCGCGGCCCATGGTAAATCCAGTTGTGTATATAG-3' (SEC ID N.º 7)

20 Ejemplo 2

### *Construcción del vector de expresión pMJ04*

25 El vector de expresión pMJ04 fue construido por PCR amplificando el terminador de celobiohidrolasa 1 de Cel7A de *Trichoderma reesei* de ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei* usando cebadores 993429 (antisentido) y 993428 (sentido) mostrados más abajo. El cebador antisentido fue creado genéticamente para tener un sitio *PacI* en el extremo 5' y un sitio *SpeI* en el extremo 5' del cebador sentido.

Cebador 993429 (antisentido):

30

5'-AACGTTAATTAAGGAATCGTTTTTGTGTTT-3' (SEC ID N.º 8)

Cebador 993428 (sentido):

35

5'-AGTACTAGTAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG-3' (SEC ID N.º 9)

40 Las reacciones de la amplificación (50  $\mu$ l) fueron compuestas de 1X tampón de reacción Thermopol (New England Biolabs, Beverly, MA), 0,3 mM dNTPs, 100 ng de ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei* (que fue aislado usando un equipo DNeasy Plant Maxi, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA), 0,3  $\mu$ M de cebador 993429, 0,3  $\mu$ M de cebador 993428 y 2 unidades de polimerasa Vent (New England Biolabs, Beverly, MA). Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 (Hamburgo; Alemania) programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón Tris base 40 mM- acetato de sodio 20 mM-EDTA disodio 1 mM (TAE) donde una banda de producto de 229 bp fue cortada del gel y purificada usando un Equipo de extracción de gel QIAquick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) según las instrucciones del fabricante.

50 El fragmento de PCR resultante fue digerido con *PacI* y *SpeI* y ligado en pAlLo1 digerido con las mismas enzimas de restricción usando un equipo de ligadura rápida (Roche, Indianápolis, IN), para generar pMJ04 (figura 2).

Ejemplo 3

55

### *Construcción del vector de expresión pCaHj568*

60 El plásmido de expresión pCaHj568 fue construido de pCaHj170 (Patente estadounidense n.º 5.763.254) y pMT2188. El plásmido pCaHj170 comprende la región de codificación de la endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* (Cel45A). El plásmido pMT2188 fue construido de la siguiente manera: El origen de replicación pUC19 fue amplificado por PCR de pCaHj483 (WO 98/00529) con cebadores 142779 y 142780 mostrados a continuación. El cebador 142780 introduce un sitio *BbuI* en el fragmento de PCR.

142779:

65

5'-TTGAATTGAAAATAGATTGATTTAAACTTC-3' (SEC ID N.º 10)

## ES 2 357 037 T3

142780:

5'-TTGCATGCGTAATCATGGTCATAGC-3' (SEC ID N.º 11)

5

El sistema Expand PCR (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Suiza) fue usado para la amplificación siguiendo las instrucciones del fabricante para ésta y amplificaciones con PCR posteriores. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa y un fragmento de 1160 bp fue aislado y purificado usando un equipo de centrifugación para extracción de gel Jetquick (Genomed, Wielandstr, Alemania).

10

El gen URA3 fue amplificado desde el vector de clonación pYES2 de *Saccharomyces cerevisiae* general (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando los cebadores 140288 y 142778 a continuación. El cebador 140288 introduce un sitio EcoRI en el fragmento de PCR.

15

140288:

5'-TTGAATTCATGGGTAATAACTGATAT-3' (SEC ID N.º 12)

20

142778:

5'-AAATCAATCTATTTTCAATTCAATTCATCATT-3' (SEC ID N.º 13)

25

Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa y un fragmento de 1126 bp fue aislado y purificado usando un equipo de centrifugación para extracción de gel Jetquick.

30

Los dos fragmentos de PCR fueron fundidos mediante mezcla y amplificados usando los cebadores 142780 y 140288 mostrados más arriba por empalme de método de recubrimiento (Horton *et al.*, 1989, *Gene* 77: 61-68). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa y un fragmento de 2263 pb fue aislado y purificado usando un equipo de centrifugación para extracción de gel Jetquick.

35

El fragmento resultante fue digerido con EcoRI y BbuI y ligado al fragmento más grande de pCaHj483 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligadura fue usada para transformar la cepa de *E. coli* DB6507 *pyrF*<sup>-</sup> (ATCC 35673) y hacerla competente por el método de Mandel y Higa, 1970, *J. Mol. Biol.* 45: 154. Los transformantes fueron seleccionados en medio sólido M9 (Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press) suplementado por litro con 1 g de casaminoácidos, 500 µg de tiamina y 10 mg de canamicina. Un plásmido de un transformante fue aislado y designado pCaHj527 (figura 3).

40

El promotor NA2/tpi presente en pCaHj527 fue sometido a mutagénesis dirigida por un enfoque de PCR simple. Los nucleótidos 134-144 fueron convertidos de GTACTAAAACC a CCGTTAAATTT usando cebador mutagénico 141223:

Cebador 141223:

45

5'-GGATGCTGTTGACTCCGGAAATTTAACGGTTTGGTCTTGCATCCC-3' (SEC ID N.º 14)

50

Los nucleótidos 423-436 fueron convertidos de ATGCAATTTAAACT a CGGCAATTTAACGG usando el cebador mutagénico 141222:

Cebador 141222:

55

5'-GGTATTGTCCTGCAGACGGCAATTTAACGGCTTCTGCGAATCGC-3' (SEC ID N.º 15)

El plásmido resultante fue designado pMT2188 (figura 4).

60

La región de codificación de la endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* fue transferida de pCaHj170 como un fragmento BamHI-Sall en pMT2188 digerida con BamHI y XhoI para generar pCaHj568 (figura 5).

### Ejemplo 4

65

#### *Construcción del vector de expresión pMJ05*

El vector de expresión pMJ05 fue construido por PCR amplificando la región de codificación de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* de 915 bp de CaHj568 usando los cebadores HiEGV-F y HiEGV-R que se muestran a continuación.

## ES 2 357 037 T3

HiEGV-F (sentido):

5'-AAGCTTAAGCATGCGTTCTCCCCCTCC-3' (SEC ID N.º 16)

5

HiEGV-R (antisentido):

5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEC ID N.º 17)

10

Las reacciones de la amplificación (50 de  $\mu$ l) fueron compuestas de 1X tampón de reacción Thermopol, 0,3 mM dNTPs, 10 ng/ $\mu$ l pCaHj568 plásmido, 0,3  $\mu$ M HiEGV-F cebador, 0,3  $\mu$ M HiEGV-R cebador y 2 unidades de polimerasa Vent. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 937 bp fue cortado del gel y purificado usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

15

Este fragmento purificado de 937 bp fue usado como ADN molde para amplificaciones posteriores usando los siguientes cebadores:

20

HiEGV-R (antisentido): 5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEC ID N.º 18)

25

HiEGV-F-recubrimiento (sentido): 5'-ACCGCGGACTGCGCATCATGCGTTCTCCCCCTCC-3' (SEC ID N.º 19)

30

Las secuencias de cebador en cursiva son homólogas a 17 bp del promotor de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei* y las secuencias de cebador subrayadas son homólogas a 29 bp de la región de codificación de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens*. El recubrimiento de 36 bp entre el promotor y la secuencia codificante permitió la fusión precisa del fragmento de 994 bp que comprende el promotor de celobiohidrolasa 1 de Cel7A de *Trichoderma reesei* al fragmento de 918 bp que comprende el marco de lectura abierto de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens*.

35

Las reacciones de amplificación (50  $\mu$ l) fueron compuestas de 1X tampón de reacción Thermopol, 0,3 mM de dNTPs, 1  $\mu$ l del fragmento de PCR de 937 bp purificado, 0,3  $\mu$ M de cebador de recubrimiento HiEGV-F, 0,3  $\mu$ M de cebador HiEGV-R y 2 unidades de polimerasa Vent. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 945 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

45

Se realizó una PCR por separado para amplificar la secuencia del promotor de celobiohidrolasa 1 de Cel7A de *Trichoderma reesei* que se extiende desde 994 bp arriba del codón de iniciación ATG del gen de ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei* usando los siguientes cebadores (el cebador sentido fue creado genéticamente para tener un sitio de restricción Sal I en el extremo 5'):

50

TrCBHpro-F (sentido):  
5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEC ID N.º 20)

55

TrCBHpro-R (antisentido):  
5'-GATGCGCAGTCCGCGGT-3' (SEC ID N.º 21)

60

Las reacciones de amplificación (50  $\mu$ l) fueron compuestas de 1X tampón de reacción Thermopol, 0,3 mM de dNTPs, 100 ng/ $\mu$ l de ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei*, 0,3  $\mu$ M de cebador TrCBHpro-F, 0,3  $\mu$ M de cebador TrCBHpro-R y 2 unidades de polimerasa Vent. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 998 bp fue cortado del gel y purificado usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

65

## ES 2 357 037 T3

El fragmento de PCR de 998 bp purificado fue usado para como ADN molde para amplificaciones posteriores usando los siguientes cebadores:

TrCBH1pro-F:

5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEC ID N.º 22)

TrCBH1pro-R-recubrimiento:

5'-GGAGGGGGGAGGAACGCATGATGCGCAGTCCGCGGT-3' (SEC ID N.º 23)

Las secuencias en cursiva son homólogas a 17 bp del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias subrayadas son homólogas a 29 bp de la región de codificación de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens*. El recubrimiento de 36 bp entre el promotor y la secuencia codificante permitió la fusión precisa del fragmento de 994 bp que comprende el promotor Cel7A de *Trichoderma reesei* al fragmento de 918 bp que comprende el marco de lectura abierto de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens*.

Las reacciones de amplificación (50 µl) fueron compuestas de tampón de reacción 1X Thermopol, 0,3 mM dNTPs, 1 µl del fragmento purificado de PCR de 998 bp, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-F, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-R-recubrimiento y 2 unidades de polimerasa Vent. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 1017 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de PCR del promotor de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei* de 1017 bp y el fragmento de PCR de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* de 945 bp fueron usados como ADN molde para la amplificación posterior usando los siguientes cebadores para fusionar precisamente el promotor de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei* de 994 bp a la región de codificación de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* de 918 pb usando la PCR de superposición.

TrCBH1pro-F:

5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEC ID N.º 24)

HiEGV-R:

5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEC ID N.º 25)

Las reacciones de amplificación (50 µl) fueron compuestas de tampón de reacción 1X Thermopol, 0,3 mM de dNTPs, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-F, 0,3 µM cebador HiEGV-R y 2 unidades de polimerasa Vent. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, y 60 segundos a 72°C, seguidos de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 120 segundos a 72°C (extensión final de 5 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 1926 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de 1926 bp resultante fue clonado en el vector pCR-Blunt-11-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un equipo de clonación de PCR ZeroBlunt TOPO siguiendo el protocolo del fabricante. El plásmido resultante fue digerido con *NotI* y *SalI* y el fragmento de 1926 bp fue purificado y ligado en pMJ04, que también fue digerido con las mismas dos enzimas de restricción, para generar pMJ05 (figura 6).

### Ejemplo 5

#### Construcción de pSMai135

La región de codificación de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 2002/095014, *E. coli* DSM 14240, menos la secuencia señal putativa, véase la figura 7, SEC ID Nos: 26 y 27) de Lys-20 al codón de parada TAA fue amplificado por PCR de pJaL660 (WO 2002/095014) como molde con cebador 993728 (sentido) y cebador 993727 (antisentido) que se muestra a continuación. Las secuencias en cursiva son homólogas a la secuencia señal de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* de 20 pb y las secuencias subrayadas son homólogas a la región de codificación de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de 22 bp. Un sitio *SpeI* fue creado genéticamente en el extremo 5' del cebador antisentido.

## ES 2 357 037 T3

Cebador 993728:

5'-TGCCGGTGTGGCCCTTGCCAAGGATGATCTCGCGTACTCCC-3' (SEC ID N.º 28)

5

Cebador 993727:

5'-GACTAGTCTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3' (SEC ID N.º: 29)

10

Las reacciones de amplificación (50 µl) fueron compuestas de tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM de dNTPs, 10 ng/µl de pJaL660, 6,4 µM de cebador 993728, 3,2 µM de cebador 993727, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 unidades de polimerasa *Pfx*. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 180 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 2523 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

15

Se realizó una amplificación con PCR separada para amplificar 1000 bp del promotor de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei* y 63 bp de la secuencia señal de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* putativa (codón de iniciación ATG a Ala-21, figura 8, SEC ID Nos: 30 (secuencia de ADN) y 31 (secuencia de amino ácido deducido); n.º de acceso AAB03660 para la secuencia de ADN), usando cebador 993724 (sentido) y cebador 993729 (antisentido) mostrados a continuación. Las secuencias de cebador en cursiva son homólogas a 20 bp de la secuencia señal de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* y las secuencias de cebador subrayadas son homólogas a 22 bp de la región de codificación de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. El plásmido pMJ05, que comprende la región de codificación de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* bajo el control del promotor de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei*, fue usado como un molde para generar un fragmento de 1063 bp que comprende el promotor de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei*/el fragmento de secuencia señal de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens*. Un recubrimiento de 42 bp fue compartido entre el promotor Cel7A de *Trichoderma reesei*/la secuencia señal de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* y la secuencia de codificación de *Aspergillus oryzae* para proporcionar una unión perfecta entre el promotor y el codón de iniciación ATG de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de 2523 bp.

25

30

Cebador 993724:

35 5'-ACGCGTGCACCGAATGTAGGATTGTTATCC-3' (SEC ID N.º 32)

Cebador 993729:

40 5'-GGGAGTACGCGAGATCATCCTTGGCAAGGGCCAACACCGGCA-3' (SEC ID N.º 33)

50

Las reacciones de amplificación (50 µl) fueron compuestas de tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM de dNTPs, 10 ng/µl de pMJ05, 6,4 µM de cebador 993728, 3,2 µM de cebador 993727, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, y 2,5 unidades de polimerasa *Pfx*. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 60°C y 240 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos) Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 1063 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

45

Los fragmentos de superposición purificados fueron usados como un molde para la amplificación usando el cebador 993724 (sentido) y el cebador 993727 (antisentido) anteriormente descritos para fusionar precisamente el promotor de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei* de 1063 bp/el fragmento de secuencia señal de endoglucanasa V5 de *Humicola insolens* a los 2523 bp de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* por PCR de superposición.

55

Las reacciones de amplificación (50 µl) fueron compuestas de tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM dNTPs, 6,4 µM cebador 993724, 3,2 µM cebador 993727, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 2,5 unidades de polimerasa *Pfx*. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 60°C y 240 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos). Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 3591 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

60

El fragmento de 3591 bp resultante fue digerido con *SalI* y *SpeI* y ligado en pMJ04 digerido con las mismas enzimas de restricción para generar pSMai135 (figura 9).

65

## Ejemplo 6

*Expresión de beta-glucosidasa de Aspergillus oryzae en Trichoderma reesei*

5 El plásmido pSMai135 que codifica la enzima de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* madura, vinculado a la señal de secreción de endoglucanasa 5 de *Humicola insolens* (figura 8, SEC ID Nos: 30 (secuencia de ADN) y 31 (secuencia de aminoácidos deducida), fue introducido en RutC30 de *Trichoderma reesei* por transformación mediada por PEG. El plásmido de expresión contiene el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* para permitir que los transformantes se desarrollen en acetamida como la única fuente de nitrógeno.

10 La preparación de protoplasto y la transformación fue realizada usando un protocolo modificado por Penttila *et al.*, 1987, Gene 61: 155-164. Brevemente, RutC30 de *Trichoderma reesei* fue cultivada a 27°C y 90 r.p.m. en 25 ml de medio YP suplementado con 2% (p/v) de glucosa y 10 mM de uridina durante 17 horas. Los micelios fueron recogidos por filtración usando el sistema de filtración desechable impulsado por vacío Millipore (Millipore, Bedford, MA) y lavados dos veces con agua desionizada y dos veces con 1,2 M de sorbitol. Los protoplastos fueron generados suspendiendo los micelios lavados en 20 ml de 1,2 M de sorbitol con 15 mg de Glucanex (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) por ml y 0,36 unidades de quitinasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) por ml e incubados durante 15-25 minutos a 34°C con agitación suave a 90 r.p.m. Los protoplastos fueron recogidos por centrifugado durante 7 minutos a 400 x g y lavados dos veces con 1,2 M de sorbitol frío. Los protoplastos fueron contados usando un hemacitómetro y resuspendidos en STC a una concentración final de  $1 \times 10^8$  protoplastos por ml. Los protoplastos de exceso fueron almacenados en un contenedor de congelación Cryo 1°C (Nalgene, Rochester, NY) a -80°C.

25 Se agregaron aproximadamente 7 µg de pSMai135 digerido con *PmeI* a 100 µl de solución de protoplasto y se mezcló suavemente, seguido de 260 µl de tampón PEG, se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se agregó STC (3 ml), se mezcló y la solución de transformación fue colocada en placas COVE usando selección de *amdS* de *Aspergillus nidulans*. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5-7 días. Los transformantes fueron subcultivados sobre placas COVE2 y se desarrollaron a 28°C.

30 Sesenta y siete transformantes (SMA135-01 a SMA135-67) conteniendo el gen de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* fueron seleccionados de forma aleatoria y cultivados en frascos de agitación de 125 ml disipados conteniendo 25 ml de medios de inducción de celulosa a 28°C y 200 r.p.m. durante 7 días. RutC30 de *Trichoderma reesei* fue probada como un control. Las muestras de caldo de cultivo fueron eliminadas 7 días después de la inoculación, centrifugadas a 15.700 x g durante 5 minutos en un micro-centrifugador y los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta el ensayo enzimático. Los sobrenadantes fueron evaluados en cuanto a la actividad de beta-glucosidasa usando P-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato, como se describió anteriormente.

40 Varios transformantes SMA135 mostraron actividades de beta-glucosidasa varias veces más que RutC30 de *Trichoderma reesei*. El transformante SMA135-04 produjo la actividad de beta-glucosidasa más alta con 7 veces más actividad de beta-glucosidasa que la producida por RutC30 de *Trichoderma reesei* como un control.

45 La electroforesis en poliacrilamida SDS se efectuó usando el geles de Criterion Tris-HCl (resolución del 5%) (BioRad, Hercules, CA) con The Criterion System (BioRad, Hercules, CA). Cinco µl de sobrenadantes del día 7 (véase más arriba) fueron suspendidos en 2X concentración de tampón de muestra Laemmli (BioRad, Hercules, CA) y hervidos durante 3 minutos en presencia de betamercaptoetanol al 5%. Las muestras de sobrenadantes fueron cargadas sobre un gel de poliacrilamida y sometidas a electroforesis con 1 X tris/Glicina/SDS como tampón de desplazamiento (BioRad, Hercules, CA). El gel resultante fue manchado con Bio-Safe Coomassie Stain de BioRad.

50 Veintiséis de los 67 transformantes de *Trichoderma reesei* SMA135 produjeron una proteína de aproximadamente 110 kDa que no fue visible en la cepa huésped, RutC30 de *Trichoderma reesei*. El transformante de *Trichoderma reesei*, SMA135-04, produjo el nivel máximo de beta-glucosidasa.

## Ejemplo 7

55 *Producción de beta-glucosidasa de Aspergillus oryzae recombinante en Trichoderma reesei por fermentación*

60 La fermentación fue realizada en la cepa de *Trichoderma reesei* SMA135-04 para producir cantidades de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. RutC30 de *Trichoderma reesei* (cepa huésped) fue probada como un control. Las fermentaciones fueron realizadas usando las condiciones estándares como describen Mandels y Weben, 1969, Adv. Chem. Ser. 95: 391-413) en celulosa al 2%. Las fermentaciones se produjeron durante 165 horas, tiempo en el que los caldos de fermentación finales fueron centrifugados y los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta el ensayo de actividad de beta-glucosidasa usando el procedimiento descritos anteriormente.

65 Se determinó que la actividad de beta-glucosidasa en la muestra de fermentación SMA135-04 de *Trichoderma reesei* fue aproximadamente 8 veces más activa que la de RutC30 de *Trichoderma reesei*.



## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 8

#### *Identificación de un gen de beta-glucosidasa de familia GH3A en la secuencia genómica de Aspergillus fumigatus*

5 Se realizó una búsqueda Blast (Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) de la secuencia de genoma parcial de *Aspergillus fumigatus* (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD) usando como pregunta una secuencia de proteína de beta-glucosidasa de *Aspergillus aculeatus* (nº. de acceso P48825). Diferentes genes fueron identificados como homólogos de familia GH3A putativos sobre la base de un alto grado de similitud a la secuencia de pregunta en el nivel de aminoácidos. Se escogió una región genómica de aproximadamente 3000 bp con más del  
10 70% de identidad a la secuencia de pregunta en el nivel de aminoácidos para estudio adicional.

### Ejemplo 9

#### 15 *Extracción de ADN genómico de Aspergillus fumigatus*

*Aspergillus fumigatus* fue cultivada en 250 ml de medio de dextrosa de patata en un matraz vibrante disipado a 37°C y 240 r.p.m. Los micelios fueron recogidos por filtración, lavados dos veces en TE (10 mM Tris-1 mM EDTA) y congelados bajo nitrógeno líquido. Los micelios congelados fueron molidos, con mortero y mano de mortero, y convertidos a un polvo fino, que fue resuspendido en tampón pH 8,0 con 10 mM de Tris, 100 mM de EDTA, Tritón X-100 al 1%, 0,5 M de guanidina-HCl y 200 mM de NaCl. Se agregó RNasa A libre de Dnasa a una concentración de 20 mg/litro y el lisado fue incubado a 37°C durante 30 minutos. El detrito celular fue eliminado por centrifugación y el ADN fue aislado usando una columna Qiagen Maxi 500 (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA). Las columnas fueron equilibradas en 10 ml de QBT, lavadas con 30 ml de QC y eluidas con 15 ml de QF (todos los tampones de QIAGEN Inc., Chatsworth, CA). El ADN fue precipitado en isopropanol, lavado en etanol al 70% y recuperado por centrifugación. El ADN fue resuspendido en tampón TE.

### Ejemplo 10

#### 30 *Construcción del vector de expresión pAILo2*

El gen *amdS* de pAILo1 (ejemplo 1) fue cambiado con el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans*. El plásmido pBANE10 (figura 11) fue usado como una fuente para el gen *pyrG*. El análisis de la secuencia de pBANE10 mostró que el marcador *pyrG* fue contenido dentro de un fragmento de restricción *NsiI* y no contiene sitios de restricción *NcoI* ni *PacI*. Ya que el *amdS* también es flanqueado por sitios de restricción *NsiI*, la estrategia de cambiar el marcador de selección fue un simple intercambio de fragmentos de restricción de *NsiI*. El ADN plásmido de pAILo1 y pBANE10 fue digerido con la enzima de restricción *NsiI* y los productos fueron purificados por electroforesis en gel de agarosa usando procedimientos estándares. El fragmento *NsiI* de pBANE10 con el gen *pyrG* fue ligado a la estructura de pAILo1 para reemplazar el fragmento de ADN de *NsiI* original con el gen *amdS*. Se analizaron los clones recombinantes por digestión de restricción para determinar si los mismos tenían el inserto correcto y la orientación correcta. Se seleccionó un clon con el gen *pyrG* transcrito en el sentido contrario a las agujas del reloj. El plásmido nuevo fue designado pAILo2 (figura 12).

### 45 Ejemplo 11

#### *Clonación del gen de beta-glucosidasa de la familia GH3A y construcción de un vector de expresión de Aspergillus oryzae*

50 Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados más abajo fueron diseñados para amplificar por PCR un gen de *Aspergillus fumigatus* que codifica una beta-glucosidasa de la familia GH3A del ADN genómico preparado en el ejemplo 9. Se utilizó un equipo de clonación InFusion (BD Biosciences, Palo Alto, CA) para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión, pAILo2, sin la necesidad de digestiones de restricción y ligadura.

55 Cebador directo: 5'-ACTGGATTACCATGAGATTCGGTTGGCTCG-3' (SEC ID N.º 34)

Cebador inverso: 5'-AGTCACCTCTAGTTACTAGTAGACACGGGGC-3' (SEC ID N.º 35)

60 Las letras en negrita representan la secuencia codificante. La secuencia restante es homóloga a los sitios de inserción de pAILo2.

65 Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores indicados anteriormente fueron usados en una reacción por PCR con 100 ng de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus*, tampón de amplificación 1X Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1,5 µl de 10 mM mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 2,5 unidades de ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 µl de 50 mM MgSO<sub>4</sub> y 2,5 µl de 10X pCRx solución intensificadora (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos cada

## ES 2 357 037 T3

uno a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 3 minutos. El bloque de calor luego pasó a un ciclo de remojo a 4°C.

5 Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 3 kb fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick según las instrucciones del fabricante.

10 El fragmento luego fue clonado en el vector de expresión pAILo2 usando un equipo de clonación InFusion. El vector fue digerido con endonucleasas de restricción *NcoI* y *PacI* (usando las condiciones especificadas por el fabricante). El fragmento fue purificado por electroforesis en gel y el equipo de extracción de gel QIAquick. El fragmento de gen y el vector digerido fueron ligados en una reacción dando como resultado el plásmido de expresión pEJG97 (figura 13) en el que la transcripción del gen de beta-glucosidasa de familia GH3A estuvo bajo el control del promotor NA2-tpi. La reacción de ligadura (50 µl) estuvo compuesta de 1X tampón InFusión (BD Biosciences, Palo Alto, CA), 1X BSA (BD Biosciences, Palo Alto, CA), 1 µl de enzima InFusión (diluida 1:10) (BD Biosciences, Palo Alto, CA), 150 ng de pAILo2 digerido con *NcoI* y *PacI*, y 50 ng de producto purificado con PCR de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Un µl de la reacción fue usado para transformar células Solopac Gold XL10 de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA). Un transformante de *E. coli* con el plásmido pEJG97 fue detectado por digestión de restricción y el ADN plásmido fue preparado usando un Biorobot 9600 (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA).

20

### Ejemplo 12

25 *Caracterización de la secuencia genómica de Aspergillus fumigatus que codifica una beta-glucosidasa de familia GH3A*

30 La secuenciación del ADN del gen de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* de pEJG97 fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado modelo 377 XL de Perkin-Elmer Applied Biosystems (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) usando la química de terminador de coloración (Giesecke *et al.*, 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60) y estrategia de paseo de cebador. Los datos de la secuencia de nucleótidos fueron analizados en detalle en cuanto a la calidad y se compararon todas las secuencias entre sí con asistencia del software PHRED/PHRAP (Universidad de Washington, Seattle, WA).

35 Se construyó un modelo de gen para la secuencia *Aspergillus fumigatus* sobre la base de la similitud con genes homólogos de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus kawachii*. La secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º 36) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N.º 37) se muestran en la figura 10. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 863 aminoácidos, interrumpido por 8 intrones de 62, 55, 58, 63, 58, 58, 63 y 51 bp. El contenido %G+C del gen es 54,3%. Usando el programa de software SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 19 residuos. La proteína madura predicha contiene 844 aminoácidos con una masa molecular de 91,7 kDa.

40 Se determinó una alineación comparativa de secuencias de beta-glucosidasa usando el método de Clustal W (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software LASERGENET™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación: Penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineación en pareja fueron Ktuple=1, penalización de espacio=3, ventanas=5 y diagonales=5. La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* compartió 78%, 76%, y 76% de identidad con las secuencias de aminoácidos deducidas de las beta-glucosidasas de *Aspergillus aculeatus* (número de acceso P48825), *Aspergillus niger* (número de acceso 000089) y *Aspergillus kawachii* (número de acceso P87076).

50

### Ejemplo 13

55 *Expresión del gen de beta-glucosidasa de Aspergillus fumigatus de familia GH3A en JaL250 de Aspergillus oryzae*

Los protoplastos de JaL250 de *Aspergillus oryzae* fueron preparados según el método de Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Se utilizaron cinco µg de pEJG97 (así como pAILo2 como un control de vector para transformar JaL250 de *Aspergillus oryzae*).

60 La transformación de JaL250 de *Aspergillus oryzae* con pEJG97 produjo aproximadamente 100 transformantes. Diez transformantes fueron aislados en placas de PDA individuales.

65 Las placas PDA confluentes de cinco de los diez transformantes fueron lavadas con 5 ml de Tween 20 al 0,01% e inoculadas separadamente en 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml e incubadas a 34°C, 250 r.p.m. Cinco días después de la incubación, se analizaron 0,5 µl del sobrenadante de cada cultivo usando geles SDS-PAGE de tris-glicina al 8-16% (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Los perfiles de SDS-PAGE de los cultivos mostraron que uno de los transformantes (designado transformante 1) tuvo una banda más importante de aproximadamente 130 kDa.

## ES 2 357 037 T3

Una placa confluyente del transformante 1 (cultivado en PDA) fue lavado con 10 ml de Tween 20 al 0,01% e inoculada en un 2 litro de Fernbach con 400 ml de medio MDU2BP para generar caldo para caracterización de la enzima. El matraz fue recogido el día 5 y filtrado usando una membrana GP Express de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA).

Antes de los experimentos de hidrólisis, la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) fue desalada y cambiada a tampón acetato sódico 50 mM pH 5,0, usando un filtro por centrifugación Centricon Plus-20 con membrana Biomax-5 (5000 NMWL; Millipore, Bedford, MA).

### Ejemplo 14

#### Construcción de pMJ09

El vector pMJ06 fue construido amplificando por PCR el promotor de gen de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei* (*cbh1*) del ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei* usando cebadores 993696 (antisentido) y 993695 (sentido) mostrados más abajo. El cebador antisentido fue creado genéticamente para tener un sitio Sal I en el extremo 5' del cebador sentido y un sitio *NcoI* en el extremo 5' del cebador antisentido.

Cebador 993695 (sentido):

5'-ACTAGTCGACCGAATGTAGGATTGTT-3' (SEC ID N.º 38)

Cebador 993696 (antisentido):

5'-TGACCATGGTGCGCAGTCC-3' (SEC ID N.º 39)

Las reacciones de amplificación (50  $\mu\text{l}$ ) fueron compuestas de 1X tampón de reacción ThermoPol, 0,3 mM dNTPs, 100 ng de ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei* (que fue preparado usando un equipo QIAGEN DNeasy Plant Maxi), 0,3  $\mu\text{M}$  de cebador 993696, 0,3  $\mu\text{M}$  de cebador 993695 y 2 unidades de polimerasa Vent. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos).

Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 988 bp fue cortado del gel y purificado usando un equipo de extracción de gel QIAGEN QIAquick según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de PCR resultante fue digerido con *NcoI* y *SalI* y ligado en pMJ04 digerido con las mismas enzimas de restricción, usando un equipo de ligadura rápida, para generar pMJ06 (figura 14).

El vector de expresión pMJ09 fue construido amplificando por PCR el terminador del gen de celobiohidrolasa 1 Cel7A de *Trichoderma reesei* (*cbh1*) de ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei* usando cebadores 993843 (antisentido) y 993844 (sentido) mostrados más abajo. El cebador antisentido fue creado genéticamente para tener un sitio *PacI* y un sitio *SpeI* en el extremo 5' y un sitio *PvuI* en el extremo 5' del cebador sentido.

Cebador 993844 (sentido):

5'-CGATCGTCTCCCTATGGGTCATTACC-3' (SEC ID N.º 40)

Cebador 993843 (antisentido):

5'-ACTAGTTAATTAAGCTCCGTGGCGAAAG-3' (SEC ID N.º 41)

Las reacciones de amplificación (50  $\mu\text{l}$ ) fueron compuestas de 1X tampón de reacción ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 100 ng de ADN genómico de RutC30 de *Trichoderma reesei* (que fue extraído usando un equipo QIAGEN DNeasy Plant Maxi), 0,3  $\mu\text{M}$  de cebador 993844, 0,3  $\mu\text{M}$  de cebador 993843 y 2 unidades de polimerasa Vent. Las reacciones fueron incubadas en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C (extensión final de 15 minutos).

Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 473 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAGEN QIAquick según las instrucciones del fabricante.

El fragmento de PCR resultante fue digerido con *PvuI* y *SpeI* y ligado en pMJ06, digerido con *PacI* y *SpeI* usando un equipo de ligadura rápida, para generar pMJ09 (figura 15).

## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 15

#### *Clonación, caracterización y expresión del gen de endoglucanasa (eg1) de familia 7 de Trichoderma reesei*

5 Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados más abajo fueron diseñados para amplificar por PCR un gen de *Trichoderma reesei* que codifica una endoglucanasa de familia 7 putativa de ADNc obtenido a partir de RutC30 de *Trichoderma reesei* usando un equipo de células a ADNc (Ambion, Austin, TX) según las instrucciones del fabricante.

10 Cebador directo: 5'-CTTCACCATGGCGCCCTCAGTTACTACTGC-3' (SEC ID N.º 42)

Cebador inverso: 5'-GCCGTTAATTAAGGCAAGTCAACGCTCTAAAGG-3' (SEC ID N.º 43)

15 Se utilizaron cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores mencionados en una reacción de PCR con 100 ng de ADNc de *Trichoderma reesei*, 1X tampón de amplificación Pwo (Roche, Indianápolis, IN), 4 µl de 10 mM de mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP y 2.5 unidades de ADN-polimerasa Pwo (Roche, Indianápolis, IN) en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos cada a 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos. El bloque de calor luego pasó a un ciclo de remojo a 4°C.

20 Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 1,0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 1,5 kb fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel QIAquick (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) según las instrucciones del fabricante.

25 El fragmento luego fue clonado en pAILo2. El fragmento y el vector fueron digeridos con *NcoI* y *PacI*, y luego fueron purificados por electroforesis en gel y purificación de gel QIAquick. El fragmento de gen y el vector digeridos fueron ligados en una reacción dando como resultado el plásmido de expresión pJZHEG1 (figura 16) en el que la transcripción del gen *eg1* estuvo bajo el control del promotor TAKA. La reacción de ligadura (40 de µl) fue compuesta por 1X tampón de unión (Roche, Indianápolis, IN), 1X tampón de dilución de ADN (Roche, Indianápolis, IN), 5,0 unidades enzimáticas de T4 ADN-ligasa (Roche, Indianápolis, IN), 100 ng de pAILo2 digerido con *NcoI* y *PacI*, y 100 ng del producto de PCR *eg1* de *Trichoderma reesei*. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Un µl de la reacción fue usado para transformar células Solopac Gold XL10 de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA). Un transformante de *E. coli* con el plásmido pJZHEG1 fue detectado por digestión de restricción y el ADN plásmido fue preparado usando un BioRobot 9600 (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA).

30 La secuenciación del ADN del *eg1* de *Trichoderma reesei* de pJZHEG1 fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado modelo 377 XL de Perkin-Elmer Applied Biosystems (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) usando química de terminador de coloración según las instrucciones del fabricante. Los datos de la secuencia de nucleótidos fueron analizados en detalle en cuanto a la calidad y se compararon todas las secuencias entre sí con asistencia del software PHRED/PHRAP (Universidad de Washington, Seattle, WA). Una alineación comparativa de la secuencia *eg1* fue determinada usando el método de Clustal W (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) con el software Vector NTI (InfoMax, San Francisco, CA). La alineación indicó que la secuencia de aminoácido deducida del gen *eg1* de *Trichoderma reesei* es idéntica a la secuencia de aminoácidos deducida del EG1 de *Trichoderma reesei* (número de acceso AAA34212, Penttila *et al.*, 1986, Gene 45: 253-263).

35 Los protoplastos JaL250 de *Aspergillus oryzae* fueron preparados según el método de Christensen *et al.*, 1988, *supra*. Se utilizaron cinco µg de pJZHEG1 (así como pAILo2 como un control de vector) para transformar JaL250 de *Aspergillus oryzae*.

40 La transformación de JaL250 de *Aspergillus oryzae* con pJZHEG1 produjo aproximadamente 40 transformantes por µg de ADN. Veinte transformantes fueron aislados en placas PDA individuales. Cada placa fue lavada con 5 ml de Tween 20 al 0,01% e inoculada separadamente en 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml e incubada a 34°C, 250 r.p.m. Cinco días después de la incubación, se analizaron 0,5 µl del sobrenadante de cada cultivo usando geles SDS-PAGE de tris-glicina al 8-16% (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Los perfiles de SDS-PAGE de los cultivos mostraron que uno de los transformantes (designado transformante 9) tuvo una banda más importante de aproximadamente 58 kDa.

45 Una placa confluyente de transformante 9 (cultivado en PDA) fue lavada con 10 ml de Tween 20 al 0,01% e inoculada en un Fernbach de 2 litros con 400 ml de medio MDU2BP para generar caldo para caracterización de la enzima. El matraz fue recogido el día 5 y filtrado usando una membrana GP Express de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA). La actividad de endoglucanasa se determinó como se describe en la presente.

50 Antes de los experimentos de hidrólisis, la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) fue desalada y cambiada en tampón acetato sódico 50 mM pH 5,0 usando un filtro por centrifugación Centricon Plus-20 con membrana Biomax-5 (5000 NMWL; Millipore, Bedford, MA).

## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 16

#### *Preparación del forraje de maíz pretratado*

5 El forraje de maíz fue pretratado en el Departamento de Energía Estadounidense del Laboratorio de Energía Nacional Renovable (NREL por sus siglas en inglés) usando ácido sulfúrico diluido. Se utilizaron las siguientes condiciones para el pretratamiento: 1,4 peso % ácido sulfúrico a 165°C y 107 psi durante 8 minutos. Los sólidos insolubles en agua en forraje de maíz pretratado (PCS) con celulosa al 56,5%, hemicelulosa al 4,6% y lignina al 28,4%. La celulosa y la hemicelulosa fueron determinadas por una hidrólisis de ácido sulfúrico de dos etapas con análisis posterior de azúcares por cromatografía en fase líquida de alto rendimiento usando procedimiento analítico estándar del NREL n.º 10 002. La lignina fue determinada gravimétricamente después de hidrolizar las fracciones de celulosa y hemicelulosa con ácido sulfúrico usando procedimiento analítico estándar del NREL n.º 003. Antes de la hidrólisis enzimática, el PCS fue lavado con un volumen grande de agua DDI en un filtro de vidrio. El peso en seco del PCS lavado con agua resultó ser 24,54%.

15

### Ejemplo 17

#### *Preparación de residuo lignoso*

20

El residuo lignoso fue preparado incubando PCS al 5% con caldo de fermentación filtrado libre de células de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (producido por recombinación en *Trichoderma reesei*) a 10 mg por g de PCS bajo agitación constante en una reacción de 900 ml durante 6 días a pH 5,0, 50°C. Después de la hidrólisis, el líquido hidrolizado fue eliminado por centrifugación a 3836 x g durante 10 minutos, y el residuo enriquecido con lignina 25 sólida fue lavado cuatro veces con 250 ml de agua desionizada. El residuo luego fue incubado durante 5 días en 250 ml de agua desionizada bajo agitación constante a 65°C para inactivar cualquier enzima adsorbida restante. Después del lavado adicional con agua desionizada seguida de centrifugación como se describió anteriormente, se obtuvieron aproximadamente 100 ml de una suspensión al 15% de residuo lignoso en agua desionizada.

30

### Ejemplo 18

#### *Análisis de azúcar*

35 Alícuotas de veinte  $\mu\text{l}$  fueron eliminadas de reacciones de hidrólisis PCS en puntos de tiempo específicos usando una pipeta de 8 canales, y se agregaron a 180  $\mu\text{l}$  de mezcla alcalina (102 mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  más 58 mM de  $\text{NaHCO}_3$ ) en una placa de filtración MultiScreen HV de 96 pocillos (Millipore, Bedford, MA) para terminar la reacción. Las muestras fueron filtradas al vacío en otra microplaca de fondo plano para eliminar el residuo de PCS. Después de dilución apropiada, se analizó el azúcar de reducción (RS) en los filtrados usando ensayo de hidracida de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) (Lever M., 1973, Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide, Biochemical Medicine 7: 274-281) en un formato de microplaca.

40

Un alícuota de 90  $\mu\text{l}$  de la muestra diluida fue colocada en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos de fondo cónico (Corning Inc., Acton, MA, Costar, policarbonato claro). El ensayo se inició añadiendo 60  $\mu\text{l}$  de PHBAH al 1,25% en hidróxido sódico al 2% a cada pocillo. La placa descubierta fue calentada en un bloque de calentamiento hecho a medida durante 10 minutos a 95°C. Después de que la microplaca fuera enfriada a temperatura ambiente, se agregaron 35  $\mu\text{l}$  de agua desionizada a cada pocillo. Se eliminó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de cada pocillo y se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Corning Inc., Acton, MA, Costar, poliestireno de unión de medio). La absorbencia a 410 nm ( $A_{410}$ ) se midió usando un lector de microplacas SpectraMAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El valor  $A_{410}$  se tradujo en equivalentes de glucosa usando una curva estándar.

50

La curva estándar se obtuvo con seis estándares de glucosa (0,005, 0,010, 0,025, 0,050, 0,075 y 0,100 mg/ml), que fueron tratados de forma similar a las muestras. Los estándares de glucosa fueron preparados diluyendo 10 mg/ml de solución de glucosa de materia prima con agua desionizada.

55

El grado de conversión de celulosa a azúcar de reducción (rendimiento de hidrólisis, %) se calculó usando la siguiente ecuación:

60

$$\text{rendimiento RS } (\%) = \text{RS } (\text{mg/ml}) * 100 * 162 / (\text{Celulosa } (\text{mg/ml}) * 180 = \\ = \text{RS } (\text{mg/ml}) * 100 / (\text{Celulosa } (\text{mg/ml}) * 1,111)$$

En esta ecuación, RS es la concentración de azúcar de reducción en solución medida en equivalentes de glucosa (mg/ml) y el factor 1,111 refleja el aumento de peso en la conversión de celulosa a glucosa.

65

## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 19

#### *Producción mejorada de azúcares de PCS usando tensioactivo no iónico Softanol® 90 a 50°C*

5 La hidrólisis de PCS (5% p/v en una base de peso en seco) por Celluclast 1,5L (2,5, 5, 10, y 20 mg/g PCS) suplementado con beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* desalada y con tampón cambiado (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) a 0,6 mg por g de PCS se efectuó en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 en un volumen de 10 ml con agitación intermitente a 50°C. Las muestras fueron tomadas en puntos de tiempo diferentes y analizadas en relación a azúcares de reducción como se describe en el ejemplo 18. Las reacciones con Celluclast 1,5L a 2,5 y 5 mg por g de PCS fueron suplementadas con 0,5% v/v Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS), y los resultados fueron comparados con reacciones de control sin el tensioactivo.

15 Los resultados, como se muestra en la tabla 2 y la figura 17, demostraron que la adición de Softanol® 90 aumentó el rendimiento de la hidrólisis de azúcares de reducción tras la incubación durante 125 horas de 70% a 86% para reacciones con 2,5 mg PCS Celluclast/g (mejora de 23%) y de 83% a 94% para reacciones con 5 mg PCS Celluclast/g (mejora del 14%). Usando Softanol® 90, fue posible reducir la carga enzimática por un factor de dos en comparación con reacciones sin el tensioactivo, al tiempo que se alcanzó el mismo rendimiento de hidrólisis de 125 horas.

20 TABLA 2

*Efecto del Softanol® 90 (PCS 0,1 ml/g) en hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1.5L a 50°C*

Reacción	Tensioactivo, %	Tensioactivo, PCS ml/g	Conversión de 125 horas, %	Mejora a las 125 h, %
Celluclast (2,5 mg/g PCS)	0,0	0,0	70	NA
Celluclast (5 mg/g PCS)	0,0	0,0	83	NA
Celluclast (10 mg/g PCS)	0,0	0,0	97	NA
Celluclast (20 mg/g PCS)	0,0	0,0	96	NA
Celluclast ( 2,5 mg/g PCS) + Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS )	0,5	0,1	86	23
Celluclast (5 mg/g PCS) Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS)	+ 0,5	0,1	94	14

## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 20

#### *Producción mejorada de azúcares de PCS usando tensioactivo no iónico Lutensol® AT80 a 50°C*

5 El ejemplo 19 fue repetido, excepto que se utilizó Lutensol® AT80 a 0,1 ml/g PCS (0,5% v/v).

Los resultados, como se muestran en la tabla 2 y la figura 18, demostraron que la adición de Lutensol® AT80 aumentó el rendimiento de la hidrólisis de 125 horas azúcares de reducción de 70% a 82% para reacciones con 2,5 mg Celluclast/g PCS (mejora del 17%) y de 83% a 90% para reacciones con 5 mg de Celluclast/g de PCS (mejora del 9%).

### Ejemplo 21

15 *Producción mejorada de azúcares de PCS usando Softanol® 90 a 50°C y 55°C*

El ejemplo 19 fue repetido, excepto que se incluyó la carga adicional de Celluclast 1.5L (1,25 mg/g PCS), se utilizó Softanol® 90 a 0,2 ml/g de PCS (1,0% p/p) y la hidrólisis se realizó a dos temperaturas, 50°C y 55°C. Se añadió Softanol® 90 a las reacciones con 1,25, 2,5 y 5 mg de Celluclast 1.5L por g de PCS, y los resultados fueron comparados con reacciones de control sin el tensioactivo. Los resultados se muestran en la tabla 3 y las Figuras 19 y 20.

A 50°C, la adición de Softanol® 90 aumentó el rendimiento de la hidrólisis de 120 horas de azúcares de reducción en 14-20% en comparación con reacciones sin el tensioactivo. La figura 19 muestra que en presencia de Softanol® 90, la carga enzimática podría ser reducida por un factor de dos en comparación con reacciones sin el tensioactivo mientras se mantiene el mismo rendimiento de hidrólisis.

A 55°C, el Softanol® 90 mostró una mejora más significativa que a 50°C. La adición de Softanol® 90 a 55°C aumentó los rendimientos de la hidrólisis de 120 horas de azúcares de reducción en 36-59% en comparación con reacciones sin el tensioactivo. La figura 20 muestra que en presencia de Softanol®, cargas de enzima cuatro veces inferiores en comparación con reacciones sin el tensioactivo podrían conseguir rendimientos de hidrólisis comparables de azúcares de reducción.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 357 037 T3

TABLA 3

*Efecto del Softanol® 90 (0,2 ml/g PCS) en hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1.5L a 50°C y 55°C*

T°C	Reacción	Softanol® 90, ml/g de PCS	Conversión de 12 horas %	Mejora a 120 h, %
50	Celluclast (1,25 mg/g PCS)	0,0	52	NA
	Celluclast (2,5 mg/g PCS)	0,0	64	NA
	Celluclast (5 mg/g PCS)	0,0	80	NA
	Celluclast (10 mg/g PCS)	0,0	92	NA
	Celluclast (20 mg/g PCS)	0,0	98	NA
	Celluclast (1,25 mg/g PCS) + Softanol® 90	0,2	62	20
	Celluclast (2,5 mg/g PCS) + Softanol® 90	0,2	75	17
	Celluclast (5 mg/g PCS) + Softanol® 90	0,2	91	14
55	Celluclast (1.25 mg/g PCS)	0.0	36	NA
	Celluclast (2.5 mg/g PCS)	0.0	42	NA
	Celluclast (5 mg/g PCS)	0.0	60	NA
	Celluclast (10 mg/g PCS)	0.0	78	NA
	Celluclast (20 mg/g PCS)	0.0	83	NA
	Celluclast (1.25 mg/g PCS) + Softanol® 90	0.2	57	59
	Celluclast (2.5 mg/g PCS) + Softanol® 90	0.2	65	54
	Celluclast (5 mg/g PCS) + Softanol® 90	0.2	82	36



## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 22

*Dependencia de dosis de Softanol® 90 para hidrólisis de PCS por Celluclast 1,5 L a 50°C*

- 5 El ejemplo 19 fue repetido, excepto que se agregó Softanol® 90 a PCS 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 ml/g PCS a reacciones con 2 mg de Celluclast 1.5L por g de PCS y se agregó beta glucosidasa de *Aspergillus oryzae* desalada y con tampón cambiado (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) a 3% de carga de Celluclast (0,6 mg/g de PCS).
- 10 Los resultados se muestran en la tabla 4 y la figura 21. La carga óptima de Softanol® 90 resultó ser 0,1 ml por g de PCS, que correspondió a una concentración de Softanol® 90 de 0.5% p/p.

TABLA 4

15 *Dependencia de dosis de Softanol® 90 para hidrólisis de PCS (5%) por Celluclast 1.5L (2 mg/g PCS) a 50°C*

Reacción	Softanol® 90, %	Softanol® 90, ml/g de PCS	Conversión de 120 horas, %	Mejora a 120 h, %
Celluclast (2 mg/g PCS)	0,0	0,0	60	NA
Celluclast (2 mg/g PCS) + Softanol® 90	0,25	0,05	72	21
	0,5	0,1	78	30
	1,0	0,2	72	20
	1,5	0,3	67	13
	2,0	0,4	67	13

### Ejemplo 23

45 *Producción mejorada de azúcares de PCS usando productos de Softanol® diferentes a 50°C*

El ejemplo 22 fue repetido, excepto que se agregaron diferentes productos de Softanol®, Softanol® 50, 90, 120 o 200, con grado en aumento de etoxilación y valores de equilibrio hidrofílico/lipofílico (HLB) en aumento a 0,2 ml por g de PCS (1.0% v/v) a reacciones con 2 mg de Celluclast 1.5L por g de PCS.

La figura 22 muestra que todos los productos de Softanol® se comportaron de forma similar, aumentando el rendimiento de hidrólisis final de azúcares de reducción en 17-30% en comparación con reacciones sin tensioactivos.

### 55 Ejemplo 24

*Efecto de Softanol® 90 en hidrólisis de PCS por Celluclast 1.5L y caldo de fermentación de Trichoderma reesei con expresión de beta-glucosidasa de Aspergillus oryzae a 50°C*

60 El ejemplo 22 fue repetido, excepto que se agregó Softanol® 90 a 0,2 ml por g de PCS (1,0% v/v) a reacciones con Celluclast 1.5L (2 mg/g PCS) suplementadas con beta glucosidasa de *Aspergillus oryzae* desalada y con tampón cambiado (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) a 0,06 mg por g de PCS o a reacciones con caldo de fermentación filtrado libre de células de Beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (producidas por recombinación en *Trichoderma reesei*) a 2 mg por g de PCS.

Sin Softanol® 90, ambas enzimas se comportaron de forma similar. La figura 23 muestra que la adición de Softanol® 90 proporcionó un efecto de ascenso comparable para ambas enzimas.

## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 25

*Efecto de mejora del Softanol® 90 en hidrólisis de PCS por CBHI de Trichoderma reesei a 40-65°C*

5 La celobiohidrolasa I (CBHI) de *Trichoderma reesei* fue aislada y purificada a homogeneidad de Celluclast 1.5L usando métodos descritos por Suumäkki *et al.*, 2000, Cellulose 7: 189-209.

10 Se realizó la hidrólisis de PCS molido/lavado con etanol (1% p/v en una base de peso en seco) por CBHI de *Trichoderma reesei* purificada (2, 5 y 10 mg/g de PCS) en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 en un volumen de 0,5 ml con agitación intermitente a 40°C, 50°C, 55°C, 60°C y 65°C. Las muestras fueron tomadas en puntos de tiempo diferentes y analizadas en cuanto a azúcares de reducción como se describe en el ejemplo 18. Las reacciones con CBHI de *Trichoderma reesei* a 2 mg/g de PCS fueron suplementadas con 0,1% v/v Softanol® 90 (0,1 ml/g PCS), y los resultados fueron comparados con reacciones de control realizadas sin el tensioactivo.

15 Los resultados se muestran en la figura 24. A 55°C, la adición de Softanol® 90 aumentó el rendimiento de la hidrólisis de 24 horas de azúcares de reducción en 94% en comparación con la reacción sin el tensioactivo (de 6,1% a 11,9%). Lograr un rendimiento de hidrólisis comparable en ausencia de Softanol® 90 requirió carga de enzima 2,5 veces más alta (5 mg/g PCS).

### 20 Ejemplo 26

*Efecto de mejora del Softanol® 90 en hidrólisis de PCS por mezcla (CBHI de Trichoderma reesei más beta-glucosidasa de Aspergillus fumigatus) a 40-65°C*

25 El ejemplo 25 fue repetido, excepto que se suplementó CBHI de *Trichoderma reesei* con beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* desalada y con tampón cambiado (producido por recombinación en *Aspergillus oryzae*) a 5% de la carga de proteína CBHI (0,1, 0,25 y 0,5 mg/g PCS).

30 Los resultados, como se muestra en la figura 25, demostraron que a 55°C, la adición de Softanol® 90 aumentó el rendimiento de la hidrólisis de 24 horas de azúcares de reducción en 115% en comparación con la reacción sin el tensioactivo (de 9,8% a 21,1 %). Lograr el rendimiento de hidrólisis comparable en ausencia de Softanol® 90 requirió carga de enzima 2,5 veces más alta (5 mg/g PCS).

### 35 Ejemplo 27

*Efecto de mejora del Softanol® 90 en hidrólisis de PCS por mezcla de CBHI de Trichoderma reesei más EGI de Trichoderma reesei más beta-glucosidasa de Aspergillus fumigatus a 40-65°C*

40 El ejemplo 25 fue repetido, excepto que se suplementó CBHI de *Trichoderma reesei* (2, 5, 10 y 20 mg/g PCS) con endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* desalada y con tampón cambiado (EGI; producido por recombinación en *Aspergillus oryzae*) a 20% de la carga de proteína CBHI (0,4, 1, 2, y 4 mg/g PCS) y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* desalada y con tampón cambiado (producido por recombinación en *Aspergillus oryzae*) a 5% de carga de proteína CBHI (0,1, 0,25, 0,5 y 1 mg/g de PCS).

45 Los resultados se muestran en la figura 26. A 55°C, la adición de Softanol® 90 aumentó el rendimiento de la hidrólisis de 24 horas de azúcares de reducción en 132% en comparación con la reacción sin el tensioactivo (de 11,9% a 27,6%). El rendimiento de la hidrólisis resultante fue superior al obtenido usando carga de enzima 2,5 veces más alta (5 mg/g de PCS) en ausencia de Softanol® 90 (27,6% contra 21,3%).

### Ejemplo 28

55 *Efecto de mejora del Softanol® 90 en la hidrólisis de PCS por mezcla de beta-glucosidasa de Aspergillus fumigatus más E1cd de Acidothermus cellulolyticus más CBHI de Trichoderma reesei a 40-65°C*

60 El Ejemplo 27 fue repetido, excepto que se utilizó endoglucanasa bacteriana, E1cd de *Acidothermus cellulolyticus* obtenido de NREL, en vez de endoglucanasa fúngica, EGI de *Trichoderma reesei*. E1cd de *Acidothermus cellulolyticus* fue expresado de TK24 de *Streptomyces lividans* según la patente estadounidense n.º 5.275.944. Una forma truncada de esta enzima fue producida sometiendo las enzimas expresadas en *Streptomyces lividans* a tratamiento proteolítico para eliminar el dominio de unión a la celulosa (Baker *et al.*, 1995, en Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides, Saddler, J. N. y Penner, M. H., eds., ACS Series 618, American Chemical Society, Washington, DC, 113-141).

65 Los resultados, como se muestra en la figura 27, demostraron que a 55°C, la adición de Softanol® 90 aumentó el rendimiento de la hidrólisis de 24 horas de azúcares de reducción en 70% en comparación con la reacción sin el tensioactivo (de 22,2% a 37,7%) El rendimiento de la hidrólisis resultante fue superior al obtenido usando carga de enzima 2,5 veces más alta (5 mg/g de PCS) en ausencia de Softanol® 90 (37,7% contra 33%).

## ES 2 357 037 T3

### Ejemplo 29

#### *Efecto de mejora del Softanol® en hidrólisis de Avicel por Celluclast 1.5L a 50°C*

5 La hidrólisis de celulosa microcristalina, Avicel f101 (1% p/v en una base de peso en seco, FMC Corporation, Filadelfia, PA) por Celluclast 1.5L (1,25, 2,5, 5, 10, y 20 mg/g celulosa) suplementada con beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* desalada y con tampón cambiado (producida por recombinación en *Aspergillus oryzae*) a 0.6 mg por g de celulosa se efectuó en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 en un volumen de 1 ml con agitación intermitente a 50°C. Las muestras fueron tomadas en puntos de tiempo diferentes y analizadas en cuanto a azúcares de reducción como se describe en el ejemplo 18. Las reacciones con Celluclast 1.5L a 1,25, 2,5 y 5 mg/g de celulosa fueron suplementadas con Softanol® 90 a 0,05, 0,1 y 0,2 ml/g de celulosa y los resultados fueron comparados con reacciones de control sin el tensioactivo.

15 Las muestras de la figura 28 que Softanol® 90 no tuvo ningún efecto de ascenso significativo en la hidrólisis de Avicel bajo las condiciones anteriores.

### Ejemplo 30

#### *Producción mejorada de azúcares de PCS usando tensioactivos no iónicos a 50°C*

20 La hidrólisis de PCS molido/lavado con agua (5% p/v en una base de peso en seco) por caldo de fermentación libre de células filtrado de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (producido por recombinación en *Trichoderma reesei*) a 2 mg por g de PCS se efectuó en presencia de varios tensioactivos no iónicos (0,1 ml/g PCS) como se muestra en la tabla 5 en un volumen de 2 ml con agitación intermitente a pH 5,0, 50°C durante 71 horas. Las muestras fueron tomadas a puntos de tiempo diferentes y analizadas para azúcares de reducción como se describe en el ejemplo 18. Los resultados fueron comparados con una reacción de control sin ningún tensioactivo.

30 La tabla 5 muestra que la adición de tensioactivos aumentó el rendimiento de la hidrólisis de 71 horas de azúcar de reducción de 60% (sin ningún tensioactivo) a 63-72% (mejora de 4-19%).

TABLA 5

35 *Efecto de tensioactivos no iónicos (0,1 ml/g de PCS) en hidrólisis de PCS (5%) por caldo de fermentación de Trichoderma reesei con beta-glucosidasa de Aspergillus oryzae expresada (2 mg/g PCS) a 50°C*

Tensioactivo	Conversión de 71 horas, %	Mejora a 71 horas, %
Ninguno	60	NA
Softanol® 50	66	8,7
Softanol® 90	72	18,8
Softanol® 120	69	14,8
Softanol® 200	71	18,3

#### *Depósito de material biológico*

55 El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del Tratado de Budapest en la Colección de Cultivos de Patentes del Servicio de Investigaciones Agrícolas, Centro de Investigaciones Regionales del Norte, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, y recibió el siguiente número de acceso:

60 Depósito Número de acceso Fecha de depósito  
TOP10 de *E. coli* (pEJG113) NRRL B-30695 17 de octubre de 2003

65 La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de este pedido de patente a la persona determinada por el comisario de patentes y marcas registradas con derecho a ello bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo substancialmente puro

de la cepa depositada. El depósito está disponible según sea necesario por leyes de patente extranjeras en países donde se presenten duplicados de la aplicación en cuestión, o su descendiente. No obstante, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención en cuestión en derogación de derechos de las patentes concedidas por acción gubernamental.

5

#### Referencias citadas en la descripción

10 *Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.*

#### Documentos de patentes citados en la descripción

- 15 ■ EP 458162 A [0021] [0021] [0021]
- US 4435307 A [0021]
- 20 ■ US 3844890 A [0021]
- WO 9117243 A [0027]
- WO 9117244 A [0027]
- 25 ■ JP 07203960 A [0027]
- WO 9206209 A [0027]
- US 20020164730 A [0046]
- 30 ■ US 4106991 A [0067]
- US 4661452 A [0067]
- 35 ■ EP 238216 A [0067]
- EP 258068 A [0080]
- WO 0060063 A [0080]
- 40 ■ WO 0032758 A [0080]
- WO 9613580 A [0082]
- 45 ■ WO 0034450 A [0082]
- WO 0192502 A [0082] [0082]
- WO 9502044 A [0090]
- 50 ■ WO 9216634 A [0102]
- WO 9201046 A [0107]
- 55 ■ JP 2238885 A [0107]
- WO 9961651 A [0118]
- WO 02095014 A [0142]
- 60 ■ US 6461837 B [0144]
- US 5763254 A [0150]
- 65 ■ WO 9800529 A [0150]
- WO 2002095014 A [0171] [0171]

- US 5275944 A [0245]
- US 60537452 B [0253]

##### 5 Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- **Ericsson**, T. *et al. Enzyme and Microbial Technology*, 2002, vol. 31, no. 3. 353-364 [0007]
- Pretreatment of biomass. **Hsu**, T.-A. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Taylor & Francis  
10 1996. 179-212 [0016]
- Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Ghosh**, P. **Singh**, A. *Adv. Appl. Microbiol.* 1993. vol. 39, 295-333 [0016]
- 15 ■ Pretreating lignocellulosic biomass: a review. **McMillan**, J. D. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production American Chemical Society* 1994. [0016]
- Ethanol production from renewable resources. **Gong**, C. S. **Cao**, N. J. **Du**, J. **Tsao**, G. T. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Springer-Verlag* 1999. vol. 65, 207-241 [0016] [0041]
- 20 ■ **Olsson**, L. **Hahn-Hagerdal**, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production *Enz. Microb. Tech.*, 1996, vol. 18, 312-331 [0016]
- **Vallander**, L. **Eriksson**, K.-E. L. Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art *Adv. Biochem. Engl. Biotechnol.*, 1990, vol. 42, 63-95 [0016]
- 25 ■ More Gene Manipulations in Fungi *Academic Press* 1991. [0022]
- **Bailey**, J.E. **Ollis**, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals McGraw-Hill Book Company* 1986. [0022]
- 30 ■ **Ghose**. *Pure and Appl. Chem.*, 1987, vol. 59, 257-268 [0029]
- **Lever et al. Anal. Biochem., 1972, vol. 47, 273-279 [0031]**
- 35 ■ van **Tilbeurgh et al. FEBS Letters**, 1982, vol. 149, 152-156 [0031]
- van **Tilbeurgh Claeysens FEBS Letters**, 1985, vol. 187, 283-288 [0031]
- 40 ■ **Himmel et al. J. Biol. Chem., 1986, vol. 261, 12948-12955 [0032]**
- **Venturi et al. J. Basic Microbiol., 2002, vol. 42, 55-66 [0033]**
- 45 ■ **Lynd**, L. R. **Wyman**, C. E. **Gemgross**, T. U. Biocommodity engineering *Biotechnol. Prog.*, 1999, vol. 15, 777-793
- Cellulose bioconversion technology. **Philippidis**, G. P. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization Taylor & Francis 1996. 179-212 [0034] [0038] [0052]
- 50 ■ **Ryu**, D. D. Y. **Mandels**, M. Cellulases: biosynthesis and applications *Enz. Microb. Technol.*, 1980, vol. 2, 91-102 [0034]
- **Gusakov**, A. V. **Sinitsyn**, A. P. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process *Enz. Microb. Technol.*, 1985, vol. 7, 346-352 [0036]
- 55 ■ **Ryu**, S. K. **Lee**, J. M. Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor *Biotechnol. Bioeng.*, 1983, vol. 25, 53-65 [0036]
- **Gusakov**, A. V. **Sinitsyn**, A. P. **Davydkin**, I. Y. **Davydkin**, V. Y. **Protas**, O. V. Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1996, vol. 56, 141-153 [0036]
- 60 ■ **Sheehan**, J. **Himmel**, M. Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol *Biotechnol. Prog.*, 1999, vol. 15, 817-827
- 65 ■ **Lynd**, L. R. **Weimer**, P. J. van **Zyl**, W. H. **Pretorius**, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*, 2002, vol. 66, 506-577 [0038]

## ES 2 357 037 T3

- **Silveira, M. M. Jonas, R.** The biotechnological production of sorbitol *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 59, 400-408 [0041]
- **Nigam, P. Singh, D.** Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute *Process Biochemistry*, 1995, vol. 30, no. 2. 117-124 [0041]
- **Ezeji, T. C. Qureshi, N. Blaschek, H. P.** Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in situ* recovery by gas stripping *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 19, no. 6. 595-603 [0041]
- **Chen, R. Lee, Y. Y.** Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1997, vol. 63-65, 435-448 [0042]
- **Richard, A. Margaritis, A.** Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, vol. 87, no. 4. 501-515 [0044]
- **Kataoka, N. A. Miya K. Kiriyaama** Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria *Water Science and Technology*, 1997, vol. 36, no. 6-7. 41-47 [0044]
- **Gunaseelan V.N.** *Biomass and Bioenergy*, 1997, vol. 13, no. 1-2. 83-114 [0044]
- **Chen, Z. Ho, N. W. Y.** Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae* *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1993, vol. 39-40, 135-147 [0055]
- **Ho, N. W. Y. Chen, Z Brainard, A. P.** Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, 1852-1859 [0055]
- **Beall, D. S. Ohta, K. Ingram, L. O.** Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli* *Biotech. Bioeng.*, 1991, vol. 38, 296-303 [0055]
- **Ingram, L. O. Gomes, P. F. Lai, X. Moniruzzaman, M. Wood, B. E. Yomano, L. P. York, S. W.** Metabolic engineering of bacteria for ethanol production *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, vol. 58, 204-214 [0055]
- **Zhang, M. Eddy, C. Deanda, K. Finkelstein, M. Picataggio, S.** Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis* *Science*, 1995, vol. 267, 240-243 [0055]
- **Deanda, K. Zhang, M. Eddy, C. Picataggio, S.** Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, 4465-4470 [0055]
- The Alcohol Textbook Nottingham University Press, 1999. [0057]
- **Alfenore et al.** Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process *Springer-Verlag* 2002. [0060]
- **Wong, K.K.Y. Tan, L. U. L. Saddler, J. N.** Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications *Microbiol. Rev.*, 1988, vol. 52, 305-317 [0068]
- Significance of esterases in the degradation of xylans **Tenkanen, M. Poutanen, K.** *Xylans and Xylanases* Elsevier 1992. 203-212 [0068]
- **Coughlan, M. P. Hazlewood, G. P.** *Hemicellulose and hemicellulases*, 1993, [0068]
- Hemicellulases: Diversity and applications **Brigham, J. S. Adney, W. S. Himmel, M. E.** *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization* Taylor & Francis 1996. 119-141 [0068]
- Enzyme Nomenclature *Academic Press* 1992. [0073]
- *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 223, 1-5 [0073]
- *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 232, 1-6 [0073]
- *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 237, 1-5 [0073]
- *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 250, 1-6 [0073]
- *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 264, 610-650 [0073]
- **Koaze et al.** *Agr. Biol. Chem. Japan*, 1964, vol. 28, 216- [0090]

## ES 2 357 037 T3

- 5     ▪ **Yoshida** *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1954, vol. 28, 66- [0090]
- **Hayashida** *et al. Agric. Biol. Chem.*, 1977, vol. 42, 927-933 [0090]
- Handbook of Proteolytic Enzymes *Academic Press* 1998. [0092]
- **Berka** *et al. Gene*, 1990, vol. 96, 313- [0092]
- 10    ▪ **Berka** *et al. Gene*, 1993, vol. 125, 195-198 [0092]
- **Gomi** *et al. Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, vol. 57, 1095-1100 [0092]
- **Montenecourt Eveleigh** *Adv. Chem. Ser.*, 1979, vol. 181, 289-301 [0116]
- 15    ▪ **Mandels Reese** *J. Bacteriol.*, 1957, vol. 73, 269-278 [0116]
- **Deshpande, M.V. Eriksson, K.-E. Pettersson, L.G.** An assay for selective determination of exo-1,4- $\beta$ -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes *Anal. Biochem.*, 1984, vol. 138, 481-487 [0140]
- 20    ▪ **Horton** *et al. Gene*, 1989, vol. 77, 61-68 [0154]
- **Mandel Higa** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 45, 154- [0155]
- **Sambrook** *et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. [0155]
- 25    ▪ **Penttila** *et al. Gene*, 1987, vol. 61, 155-164 [0179]
- **Mandels Weber** *Adv. Chem. Ser.*, 1969, vol. 95, 391-413 [0185]
- 30    ▪ **Altschul** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0187]
- **Giesecke** *et al. Journal of Virology Methods*, 1992, vol. 38, 47-60 [0194]
- **Nielsen** *et al. Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1-6 [0195]
- 35    ▪ **Higgins** *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151-153 [0196] [0214]
- **Christensen** *et al. Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1419-1422 [0197]
- 40    ▪ **Penttila** *et al. Gene*, 1986, vol. 45, 253-263 [0214]
- **Lever M.** Colorimetric and fluorometric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide, *Biochemical Medicine*, 1973, vol. 7, 274-281 [0221]
- 45    ▪ **Suumäkki** *et al. Cellulose*, 2000, vol. 7, 189-209 [0238]
- **Baker** *et al. Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides* American Chemical Society, 1995. 113-141 [0245]
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para degradar un material lignocelulósico, que comprende: tratar el material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas celulolíticas en la presencia de al menos un tensioactivo donde el tensioactivo es un alcohol etoxilado secundario, y donde la presencia del tensioactivo aumenta la degradación del material lignocelulósico en comparación con la ausencia del tensioactivo.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde el material lignocelulósico es seleccionado del grupo que consiste en material herbáceo, residuo agrícola, residuo forestal, desperdicios sólidos municipales, papel de desecho y pulpa y residuo de fábrica de papel.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde la enzima o enzimas celulolíticas son seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, endoglucanasa, celobiohidrolasa y beta-glucosidasa.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además tratar el material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una hemicelulasa, esterasa, proteasa, lacasa, peroxidasa o una mezcla de las mismas.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el método es un proceso de pretratamiento.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el método es un paso en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF).
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el método es un paso en un proceso de hidrólisis híbrida y fermentación (HHF).
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la recuperación del material lignocelulósico degradado.
- 45 9. Método para la producción de una sustancia orgánica, que comprende:
- (a) sacarificar un material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas celulolíticas en presencia de al menos un tensioactivo, donde el tensioactivo es un alcohol etoxilado secundario, y donde la presencia del tensioactivo aumenta la degradación de material lignocelulósico en comparación con la ausencia del tensioactivo;
  - (b) fermentar el material lignocelulósico sacarificado del paso (a) con uno o más microorganismos fermentativos; y
  - (c) recuperar la sustancia orgánica de la fermentación.
- 50 10. Método según la reivindicación 9, donde el material lignocelulósico es seleccionado del grupo que consiste en material herbáceo, residuo agrícola, residuo forestal, desperdicios sólidos municipales, papel de desecho y pulpa y residuo de fábrica de papel.
- 55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde la primera o más enzimas celulolíticas son seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, endoglucanasa, celobiohidrolasa y beta-glucosidasa.
- 60 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende además tratar el material lignocelulósico con una cantidad eficaz de una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una hemicelulasa, esterasa, proteasa, lacasa, peroxidasa o una mezcla de las mismas.
- 65 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente en una sacarificación y fermentación simultáneas.
14. Método según cualquiera de reivindicaciones 9 a 13, donde la sustancia orgánica es un alcohol, ácido orgánico, cetona, aminoácido o gas.
15. Método según la reivindicación 14, donde el alcohol es arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol o xilitol.



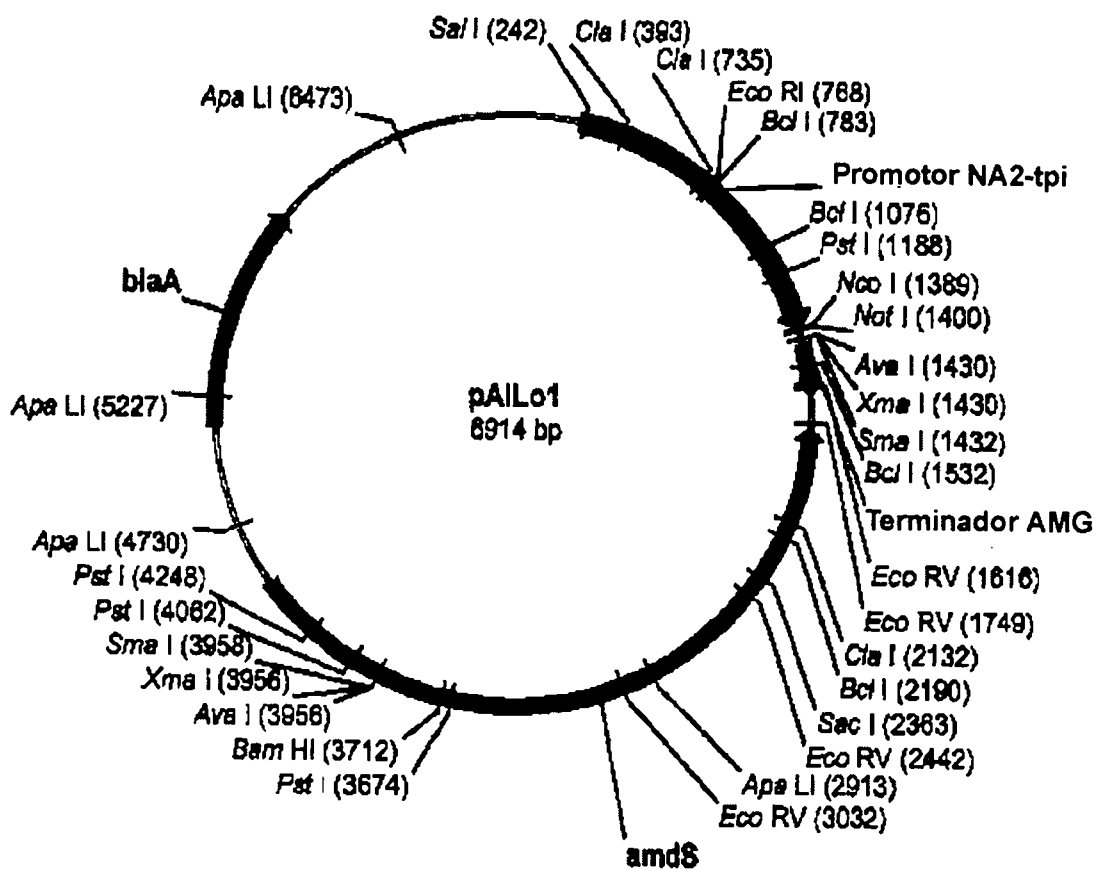


Fig. 1

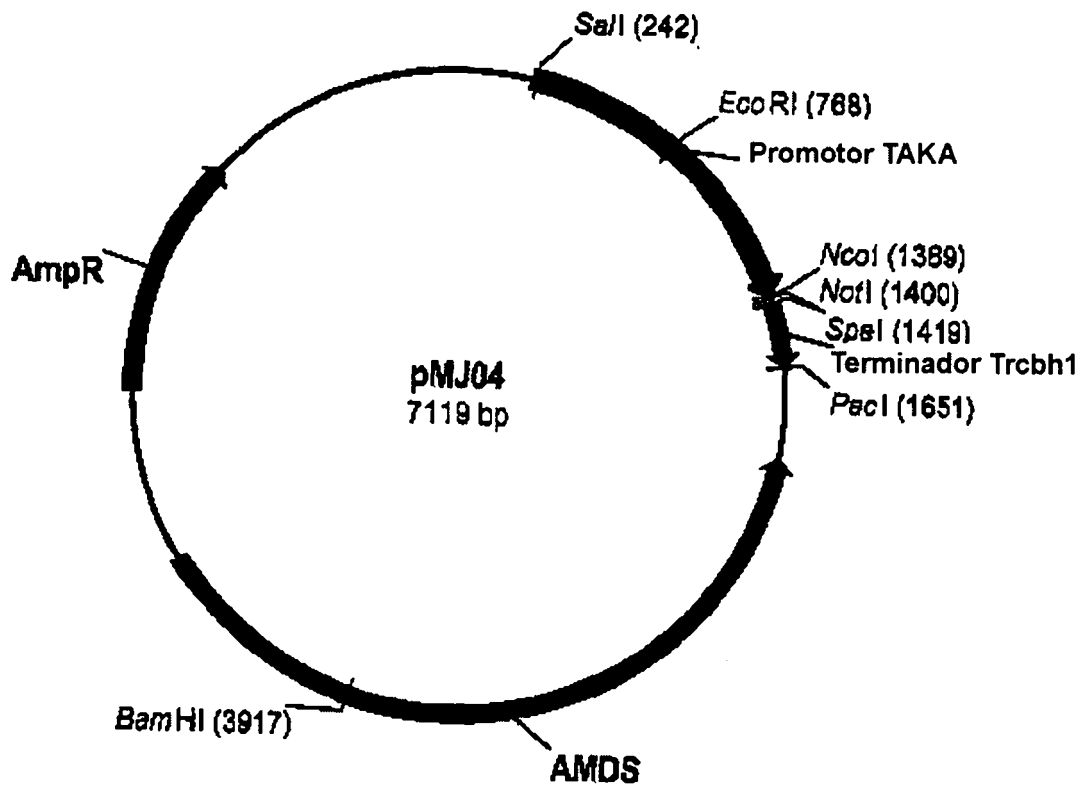


Fig. 2

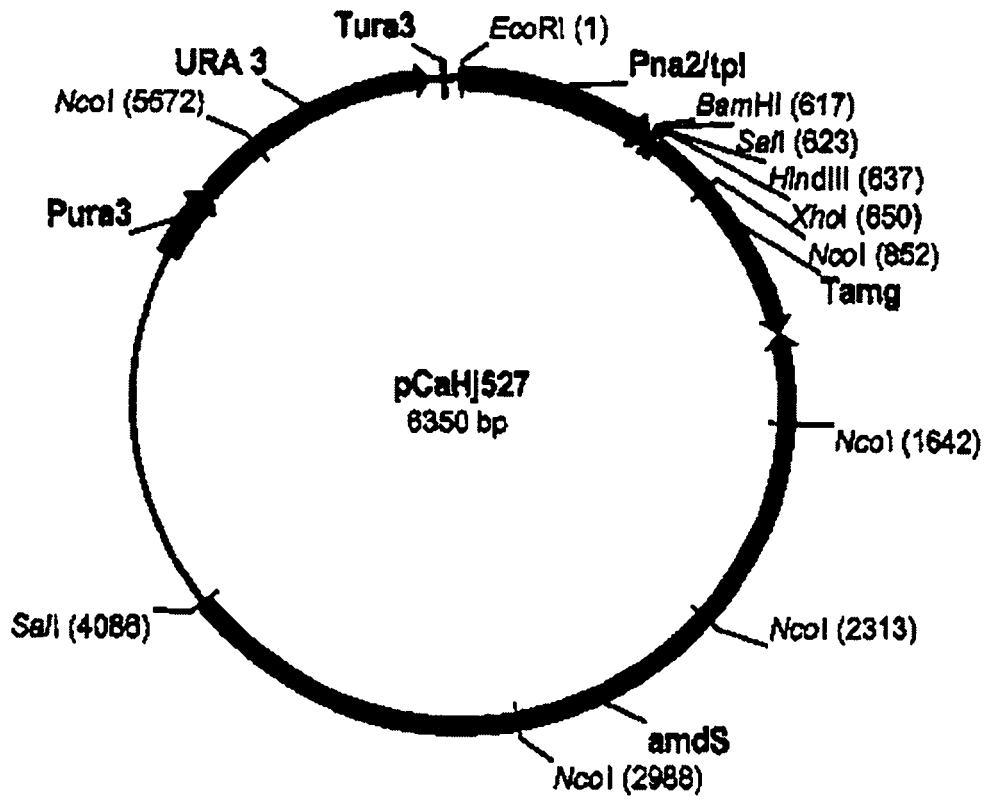


Fig. 3

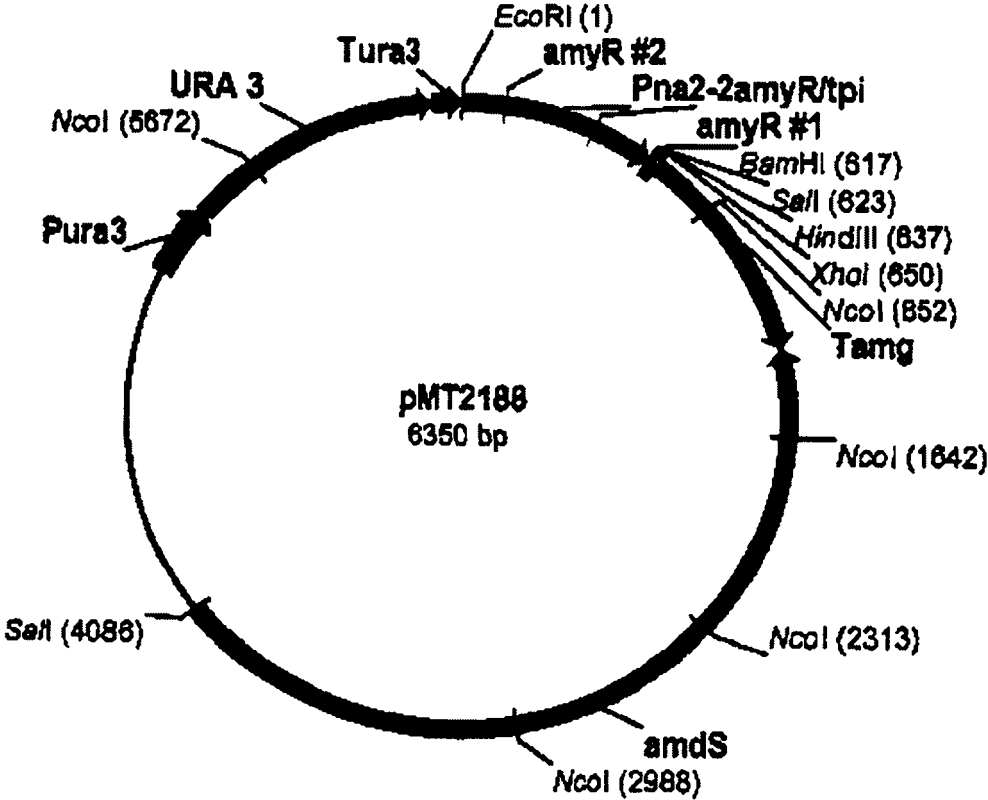


Fig. 4

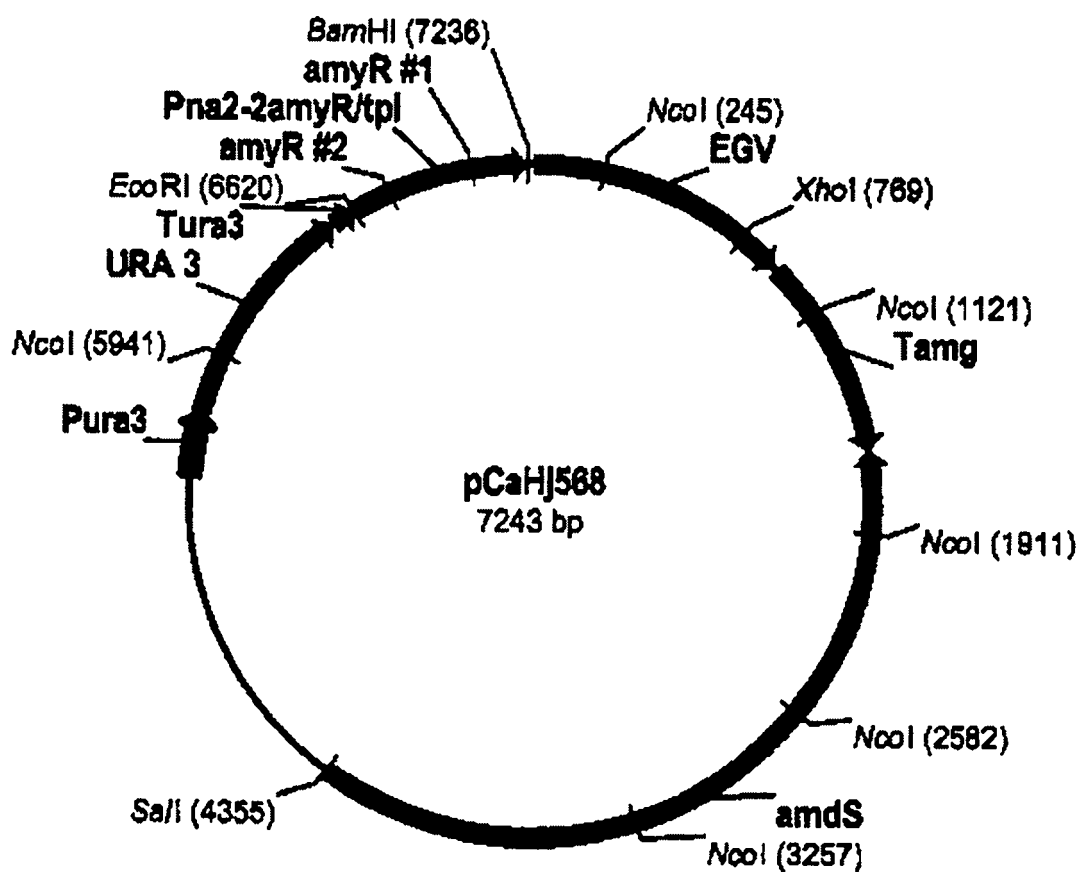


Fig. 5

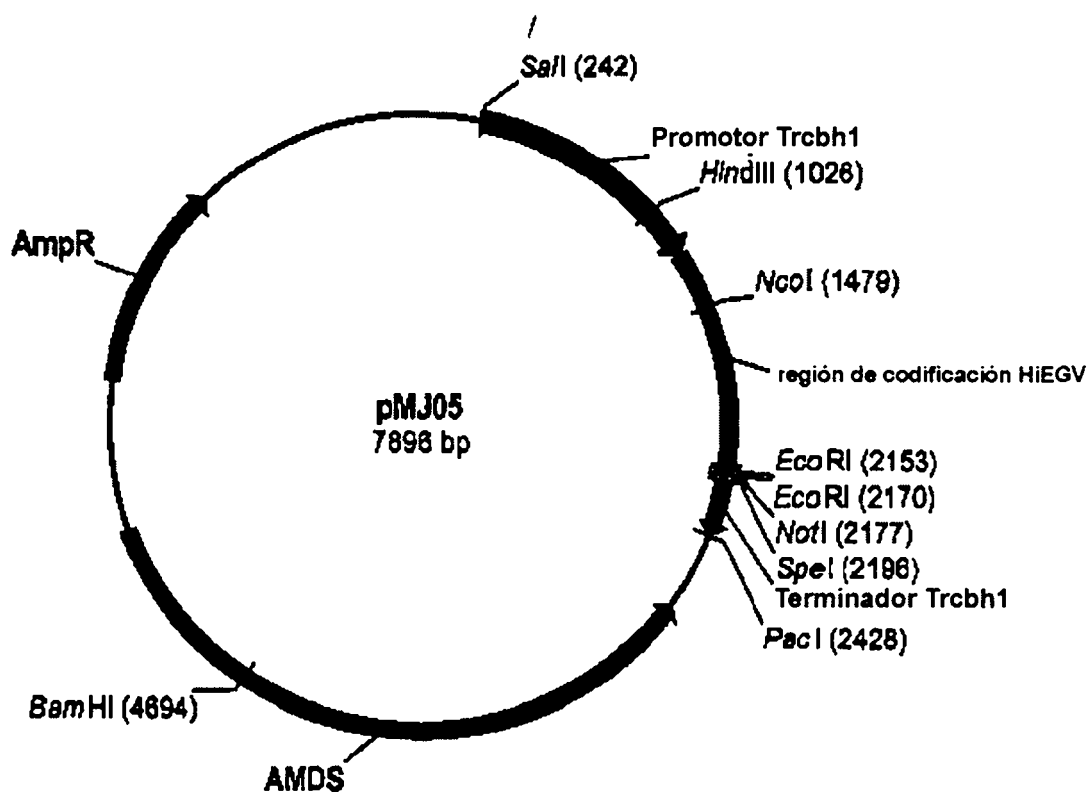


Fig. 6

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

Fig 7

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

Fig. 8



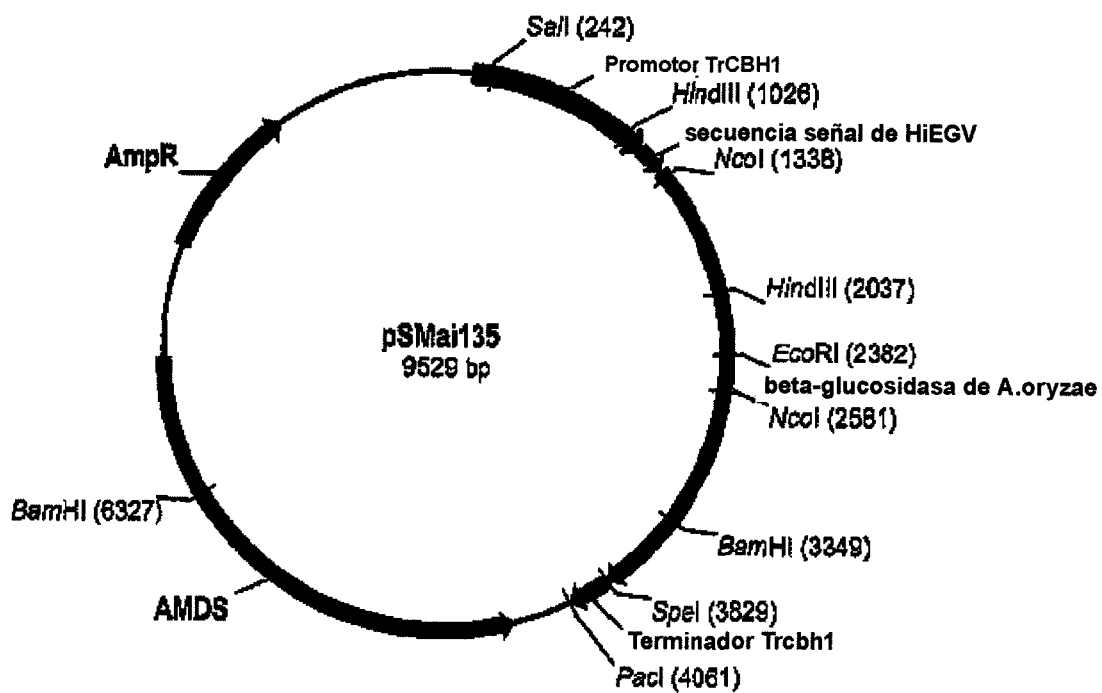


Fig. 9

ATGAGATTCCGTTGGCTCGAGTGGCCGCTCTGTGTAGCCAAATGCCAGGTTTGTGTAGTCTTCCCGTCAATGTTTCCGGATAZAGTTGA 100  
 M R F C N L E V A A L T A A A S V A H A Q  
 CAATAGTCATGGAAATATCAGGAATGGCTTCTCTCCACCATTCTACCCCTTGGCTTGGCTGATGSCCGAGAGSTGGCCAGATGCCCATCCGACCC 200  
 E L A F S P P F I F S P W A D G Q E W A D A H R X  
 GCGTGGGATCGTTTCTCAGATGACCTGGGGGAGGTTAACCTTACAGCGSTACTGGGTGGGTGGGACTTTTTTGTGTGACAGTGGAGCTTCTTC 300  
 A V E I V S Q M T L A E K V W L T T G T G  
 ACTGACCACTACACACAGATGGGAAATGACCGGATCGGTCCGTCGATACAGCGAGGTTCCAGCGTAAAGCTTGCMAATTCGCAACAGCTGCMACTGTAGTT 400  
 W X H D X C V G Q T G S V P R  
 CCTAAMACCCGCTGGTGGTACTTGGTATCAACTGGGCTTTTGTGGCCAGGATTCGCCCTTGGTATCCGTTTCTGTGACCTATACCCCGGGAGTCTTT 500  
 L G I M W G L C G Q D S P L G I R P  
 CAGTCTTGTGATATGCTGATGATGTTGCTGTATAGCTGACCTGACCTCCGCTTCCCTGTGGTACTATGTGCGCGGACATGGGACAGACACT 600  
 S D L N S A F P A G T H V A A T W D K T L  
 CGCTACCTTCGTGGCAGCCCAATGCGTGGGATTCACAGCAGGSSGTGGACATTTGCTGGGGCTGCTGCTGCTCTCTGGCCAAATATACCCGAC 700  
 A Y L R G K A M G E F M D K G V D I L L G P A A G P L G X Y P D  
 GCGGCAAGAACTGGGAGGCTTCTCTGATCCGCTTCTACCTGCTACTTTCGCCAATCTCANGGCTATCCANGACCGGGTGTGATGCTA 800  
 G G R I W E G F S P D P V L T G V L F A H T I K G I Q D A G V I A  
 CTGCCAAGCAATACATTCGAAATGACAGGAGCATTTCGACAGGTGGGAGCCCGAGGATATGTTACAACTCACAGGAGACGATCAGCTCCAAAGT 900  
 T A K H Y I L M E Q E H F R Q V G E A Q G Y N I T E T I S S H V  
 GGATGACAGACATGACAGGTTGACTTTTGGTGGTGTGACACTGCAATAATGAGGACCTTGAATGATTTACTGACCTGGAAATCCAGGCTTTGC 1000  
 D D K T M H E L X L W P F A  
 AGATGCTGTGGCGGTAGAAATTTTCCGTAGACTTGCACCTCCGACCAAGAAATCCCTGACGAACCAATCGTAGCTGGCGTGGCCCTGTCATGTTCCCTA 1100  
 D A V R A G V G A V M C S Y  
 CAATCAATCAACACAGCTAGGTTGTCAAAACAGTCAACTCTCAACAGCTCTCGAAGCTGAGCTGGGCTTCCAGGCTTCTCATGAGTGAAGTGG 1200  
 N Q I M N S Y G C Q N S Q T L M K L L X A E L G F Q G F V M S D W  
 AGCGCTACCCACAGCGGTGTCGGCCCTGCGCTGGGTTGGATATGTGGATGCTGGGAGACATTTCTTGGACCGAGGACTTCTTCTGGGCAAG 1300  
 S A H H S G V G A A L A G L D M S M P G D I S F D D G L S F W G T  
 ACCTAACTGTCAGTGTCTTAAOCCGACCCGTCAGCCCTGGCGTGTGATGACATGGCTGTTCGTATCATGACCCCGTCTACAGGTTGGTACGACCG 1400  
 M L T V S V L N G T V P A W R V D D M A V R I M T A Y Y X V G E R D R  
 TCTTCTGATCCDCCCTRACTTCCAGTCTCTGACCCCGGATGATGCTGGAGCATTTCTGCTCCGAGGAGCTTGGACAAAGTGGAACTTTC 1500  
 L R I P P N F S S W T R D E Y G M E H S A V S E R G A W T K V H D F  
 GTCATATGACAGCCAGTCACTCTCAGATCACTGGTGGATGGTGGCTAGTACAGTCTCTTGAAGACACCGGGTGTCTTCTTGGACCGGCAAGG 1600  
 V W V Q R S H S Q I I R E I G A A S T V L L X M T G A L P L T G K  
 AAGTAAAGTGGTGTCTCGGTGAGAGCCGCTTCCAAACCGTGGGTGCTAAGCCCTCCCGACCGGCTGTGATACCGGACTTCTGCTATGCG 1700  
 E V K V G V L G E D A G G M P W G A N G C P D R G C D M G T L A M A

Fig. 10A

CTGGGDTAGTGGTACGCCAATTCCTCCCTTACCCTTAGTACADCCCCGAGCAGGCTATCCAGCCGAGAGGTCAATCAGCAACCGCCGCPAATGTCCTTCTGCTGTGACT 1800  
 W G S C T A N F P Y L V T P E Q A I Q R E V I S M G G N V F A V T  
 GATAACGGGGCTCTCAGCCAGATGGCAGATGTCATCTCATATCCAGTGAAGTGGGGCTCTTAGCAAAAGCAACGTTCTCTGCAATCAAGTTTTTTAAACCA 1900  
 D N G A L S Q M A D V A S Q S B  
 TTGGCAACAGCGGTCTTTGGTGTGTTGICAAACGCGACTCTGGAGAGGGTTTCATCAGTGTCTGACGGCCACAGGGGTGACCGCCAAAAATCTCACTCTRTG 2000  
 V S L V F V N A D S G H G F I S V D G M H G D R X N L T L W  
 GAAGAAGCCGAGGCCGCTATTGACACTGTGTGACCCACTGCAACACACAGATTGTGGTDTATTCACAGTGTGGCCCGGCTCTTGATCCACCGGTTGGTAT 2100  
 X M G E A V I D T V V S H C M N T I V V I H S V C P V L I D E R W Y  
 GRTAACCCAAAGTCCATCTGGCCGGCTTGGCCCGTCCAGGAGTGGCACTCCCTGFTGACGGTCTATATGGCCGGKTCACACCCCGCG 2200  
 D N P N V T A I I W A G L P Q Q E S G N B L V D V L Y G R V N P S  
 CCAGACCCCTTACCCTGGCCAGACTGGGAGTCTTACGGGGCTCCCTTCTCACCGAGCCTAACATGSCAATGCTGCTCCAGGATGATTTCAA 2300  
 A K T P F T W G K T R E S Y G A P L L T E P M M G N G A P Q D D P N  
 CGAGGCGTCTTCAATGACTACCGTCACTTTCACAGCGCAATGAGACCCCCATTTAAGATTGGCCATGGCTTGAAGCTACACCACTTTGGTTACT 2400  
 H G V F I D Y R H F D K R N E T P I T E F G H G L S Y T T P G Y S  
 CACTTCCGGTTCAGGCCCTCAATAGTTCGAGTTCGCAATGTCXXGACTAGCGAGACCAAGCTTCGCCCAACCTATGTTGAGATCGGTAGTGGCG 2500  
 N L R V Q A L M S S S A Y V P T S G E T E P A P T Y G M I G S A  
 CCGACTCTGTATCCGAGGGTCTCAAAAGAAATACCAAGTTTATTTACCTTGGCTCAACTCGACCGACTCTGAGGATTCCTTCTGACCCACCCGACTA 2600  
 A D X L Y P E G L X R I T K F I Y P N L E S T D L E S D S D D P M Y  
 CGCTGGGAGGACTCGGAGTACATCCCAAGGCGCTAGGGATGGTCTCTCAACCCCTCTCAGAGGCTGGCCGCTCTCTGTTGTTACCCCTTACCCCTT 2700  
 G W H D S E E Y I P E G A R D G S P Q P L L K A G G A P G G M P T L  
 TNYCAGGATCTTGTAGGGTGTCCGCCACCATACCAACACTGGTAAAGTCCCGGTTATGAGTCCCTCAATGGTACGTCAGCCGCGCATGTTCTCTTGG 2800  
 Y Q D L V E V S A T I T M T G M V A G Y E V F Q L  
 TTGCAATTTGGCTAACCTCGCTTAGTATGTTTCACTGGGGCGGACCGAACGAGCCTCGGGTCCGTCAGGCTTGGACCGAATCTTCTGCTGCTCG 2900  
 Y V S L G G P N E P R V V L R K F D R I F L A P G  
 GGNGCAAAAGGTTTGGACCAAGCTCTTAACCGTGTGATCTCCCAATTTGGGATGTGGAGGCTCAGGACTGGGTCATCACAAAGTACCCCAAGAAAGTB 3000  
 E Q E V W T T T L E R R D L A N W D V E A Q D W V I T E Y P E X Y  
 CAGGTCCGAGCTCCTCCGTTAAGTGCCTCTGAGAGCGCCCTCTGCCCGTGTCTACTAG 3060  
 R V G S S R R E L P L R A P L P R V Y .

Fig. 10B

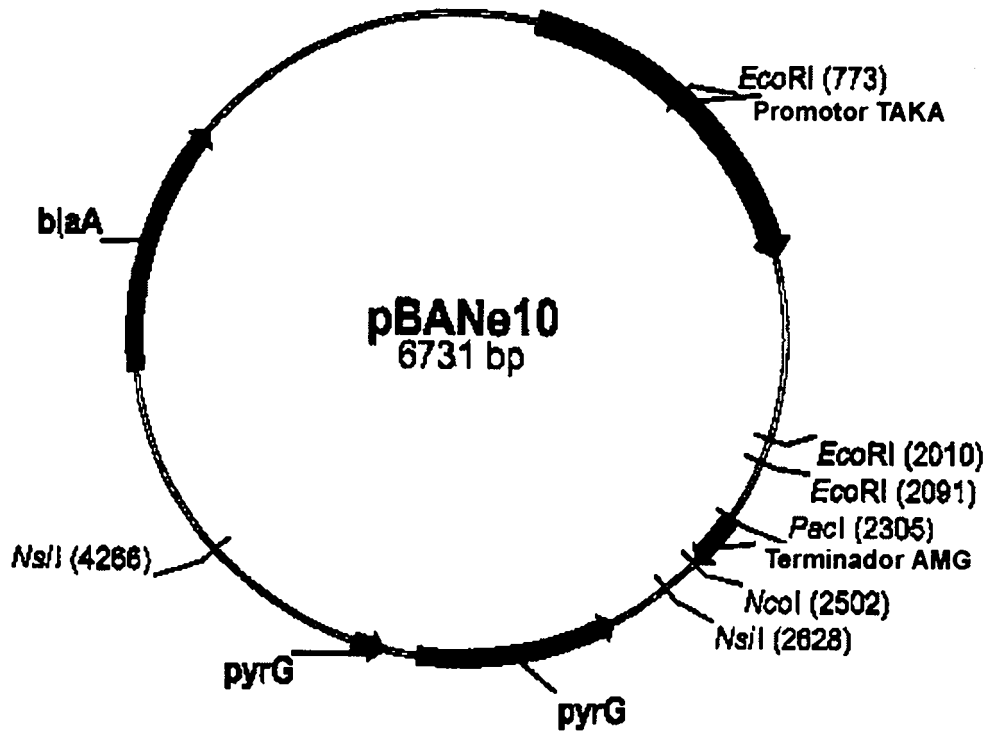


Fig. 11

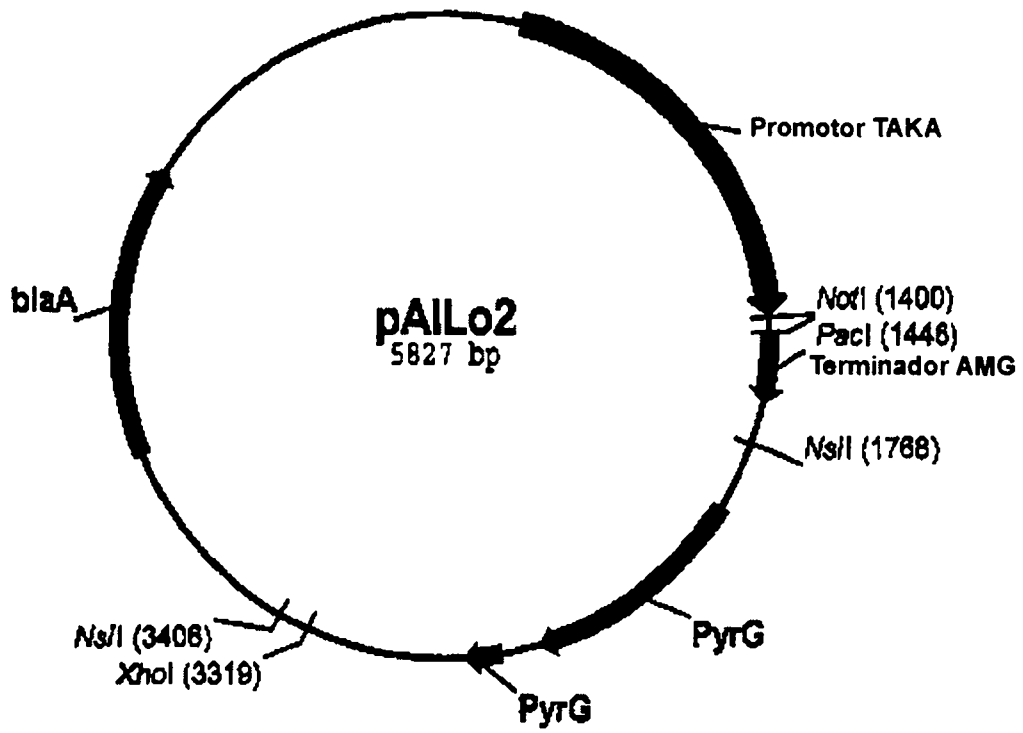


Fig. 12

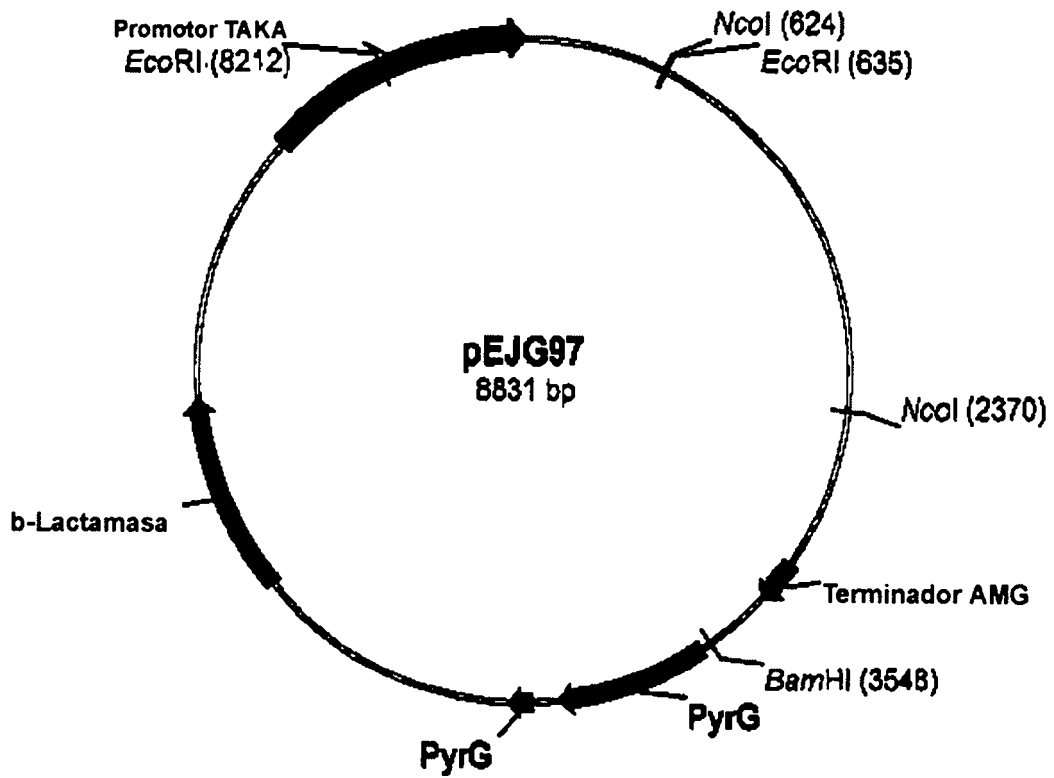


Fig. 13

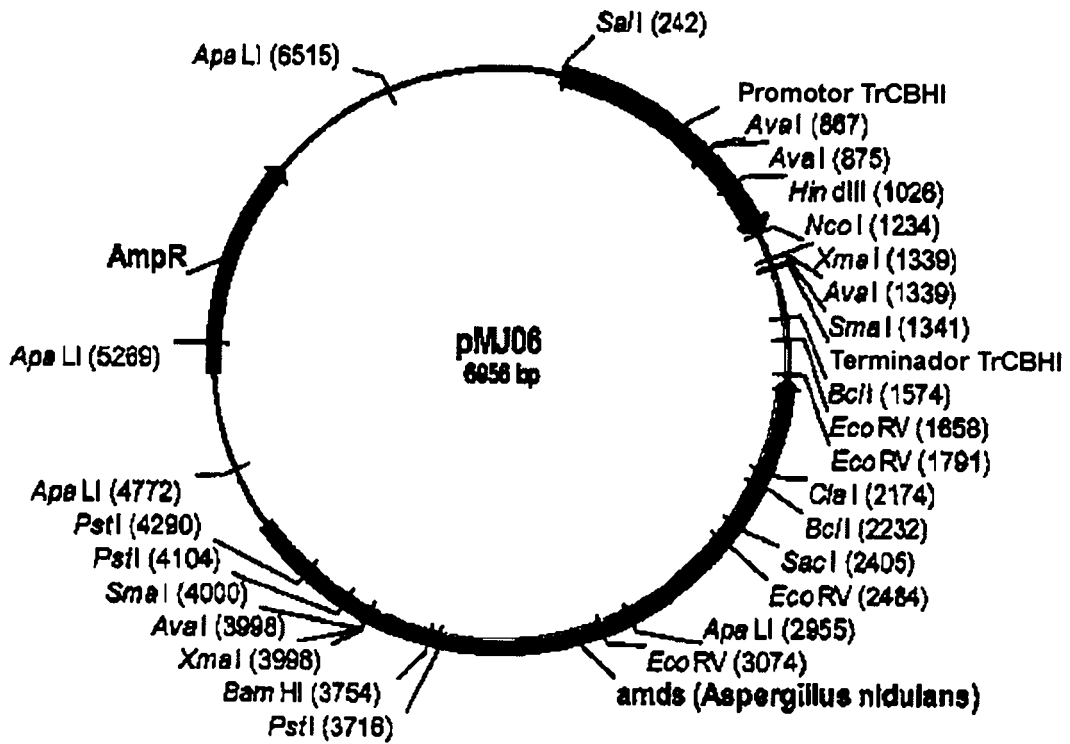


Fig. 14

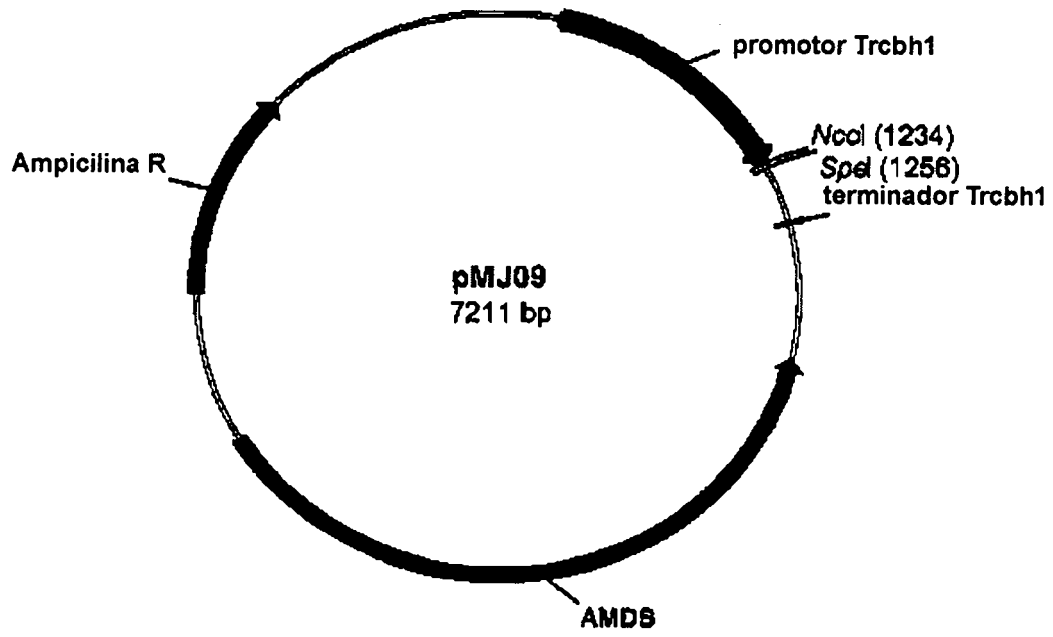


Fig. 15



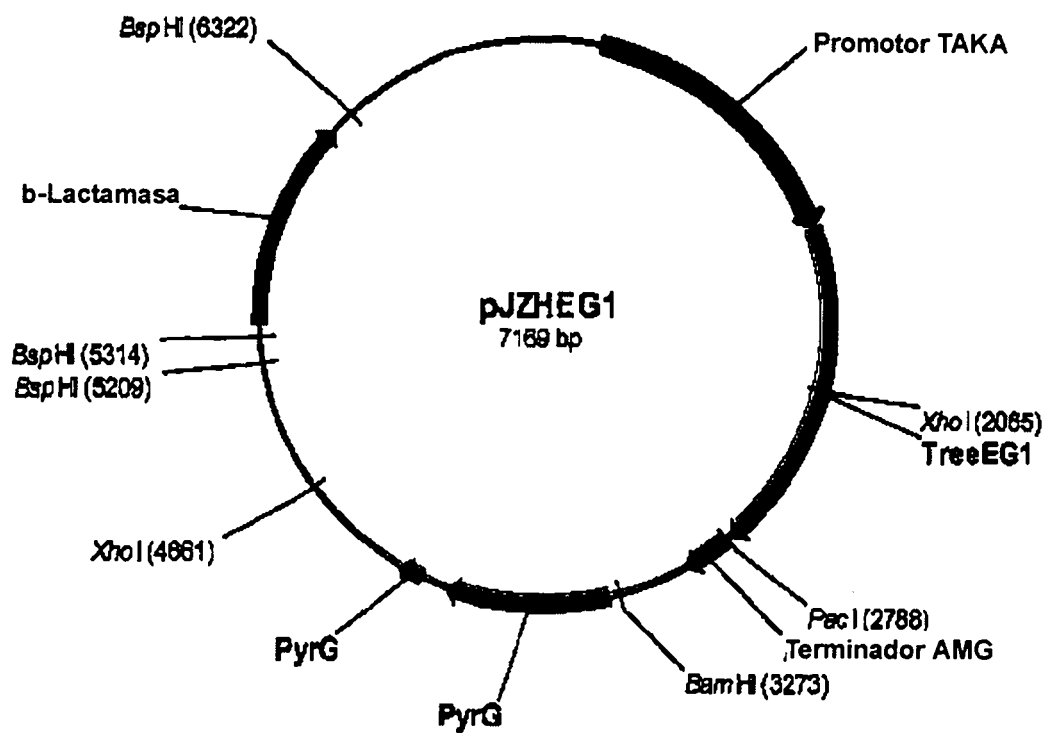


Fig. 16

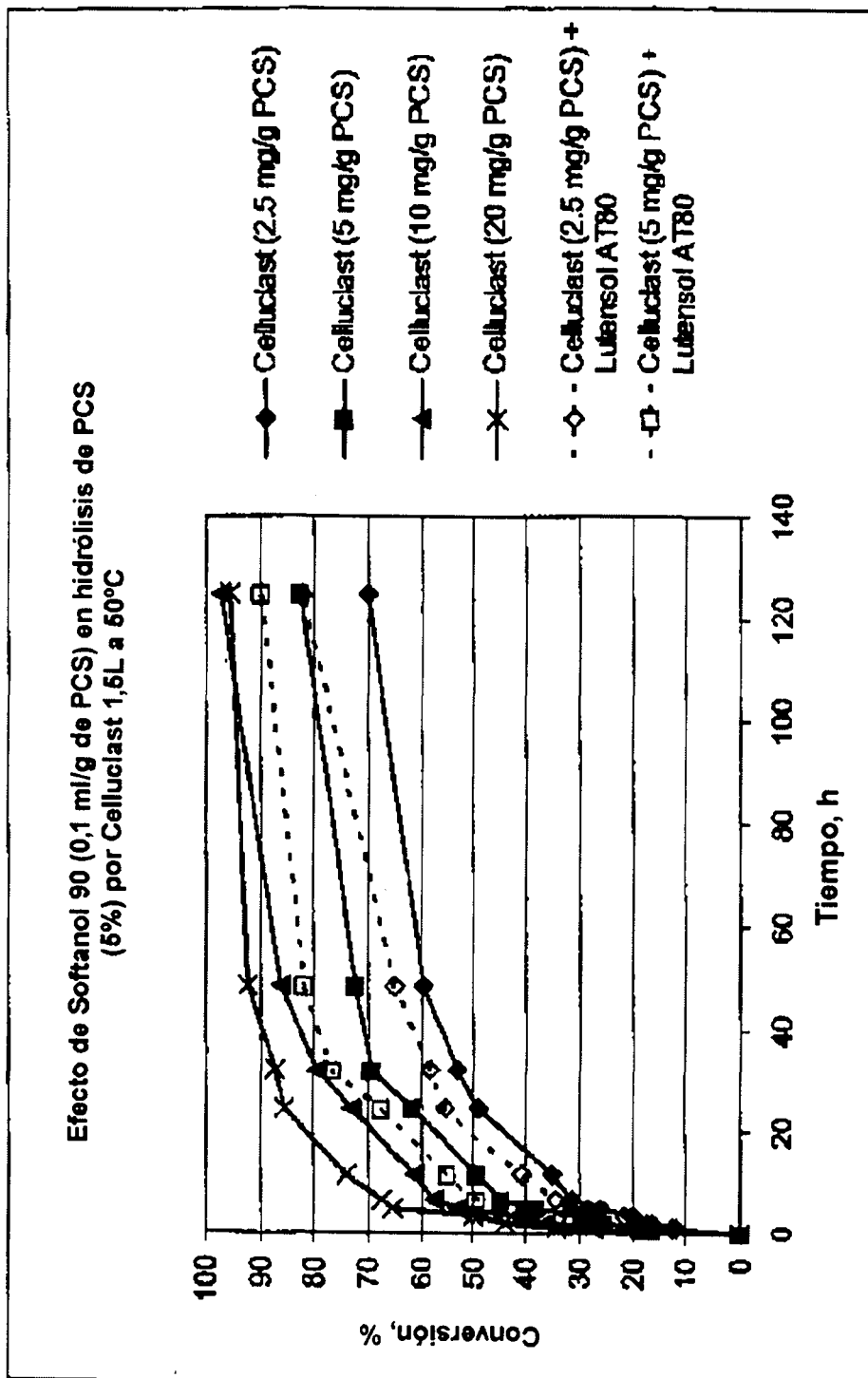


Fig. 17

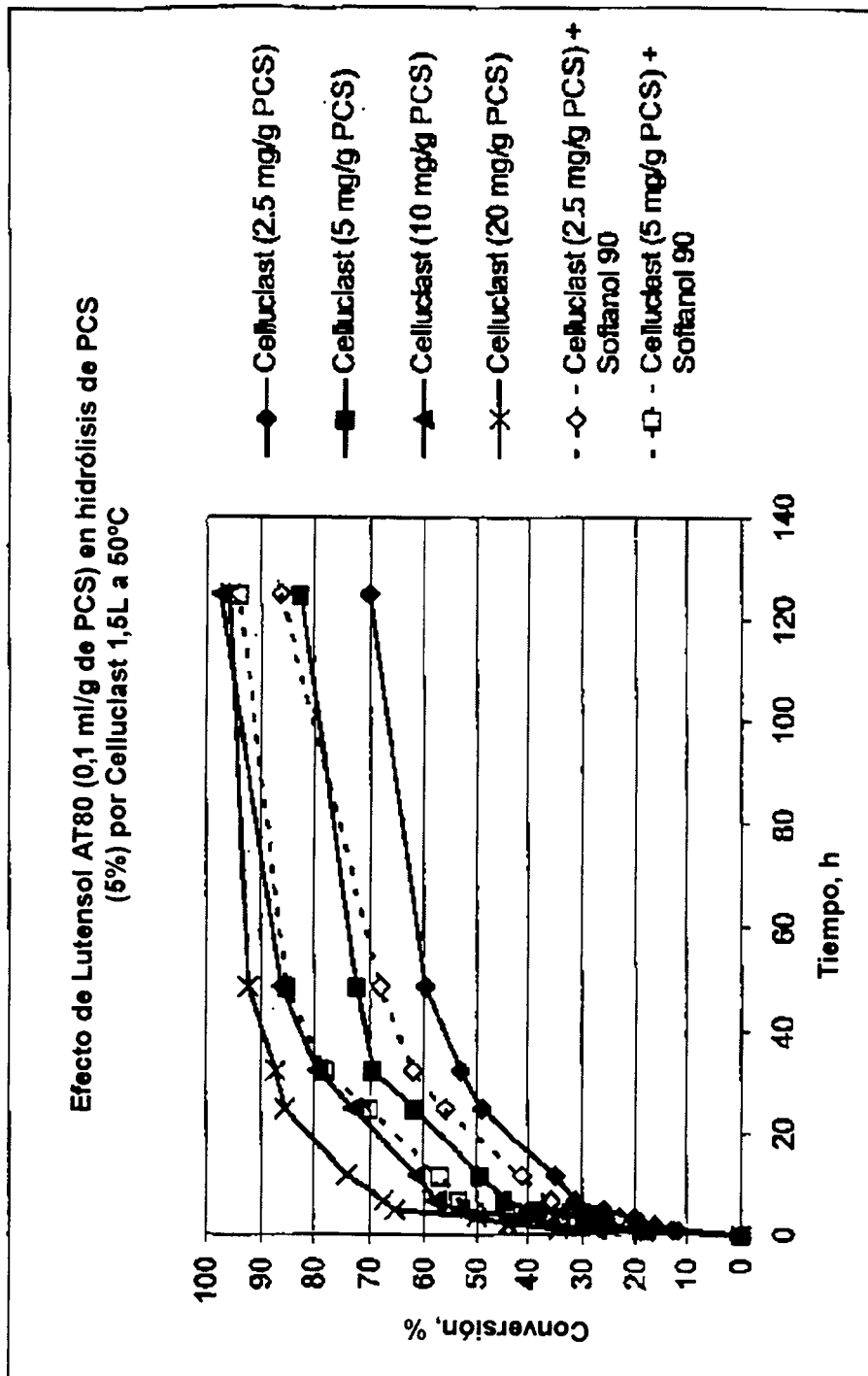


Fig. 18

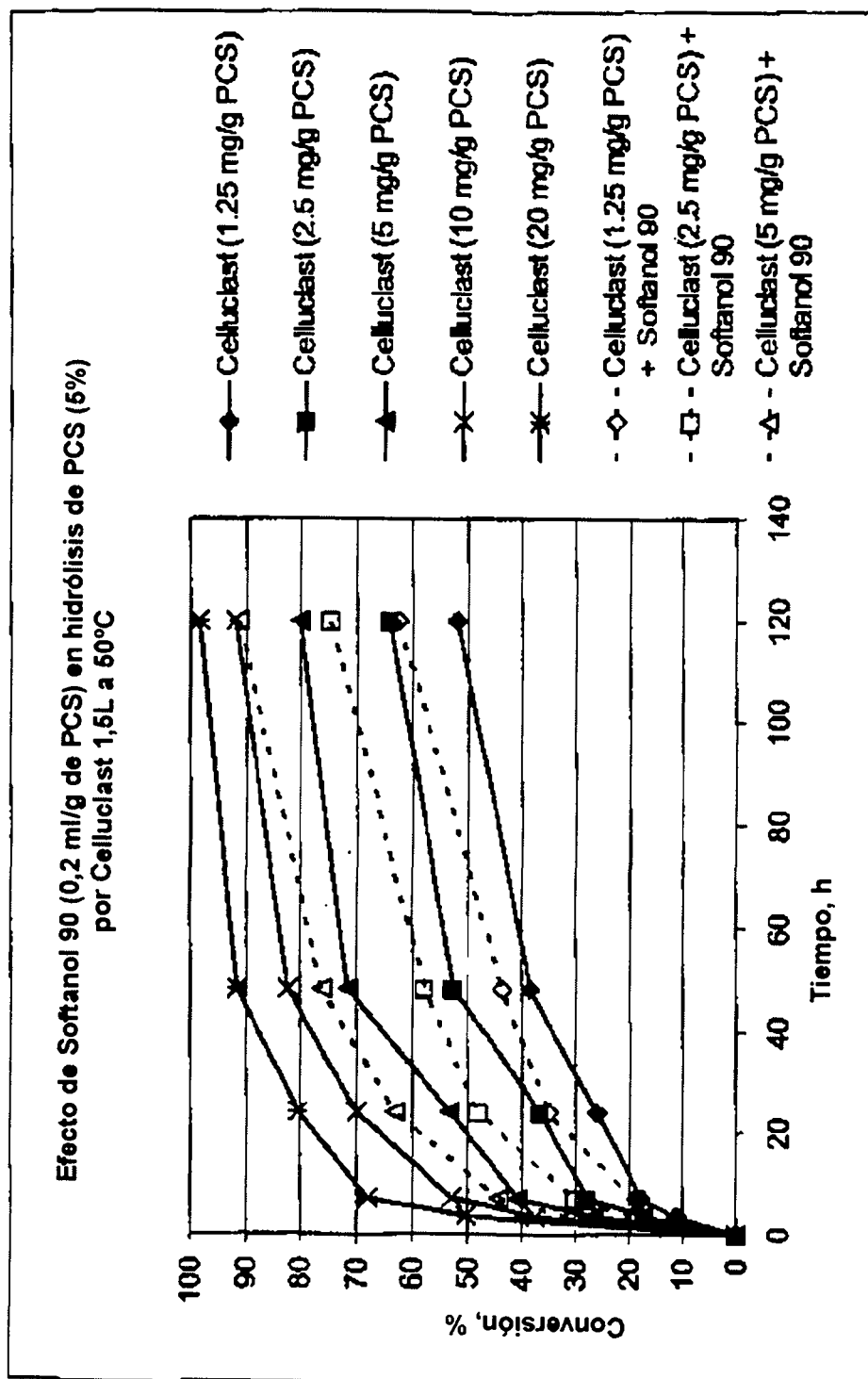


Fig. 19

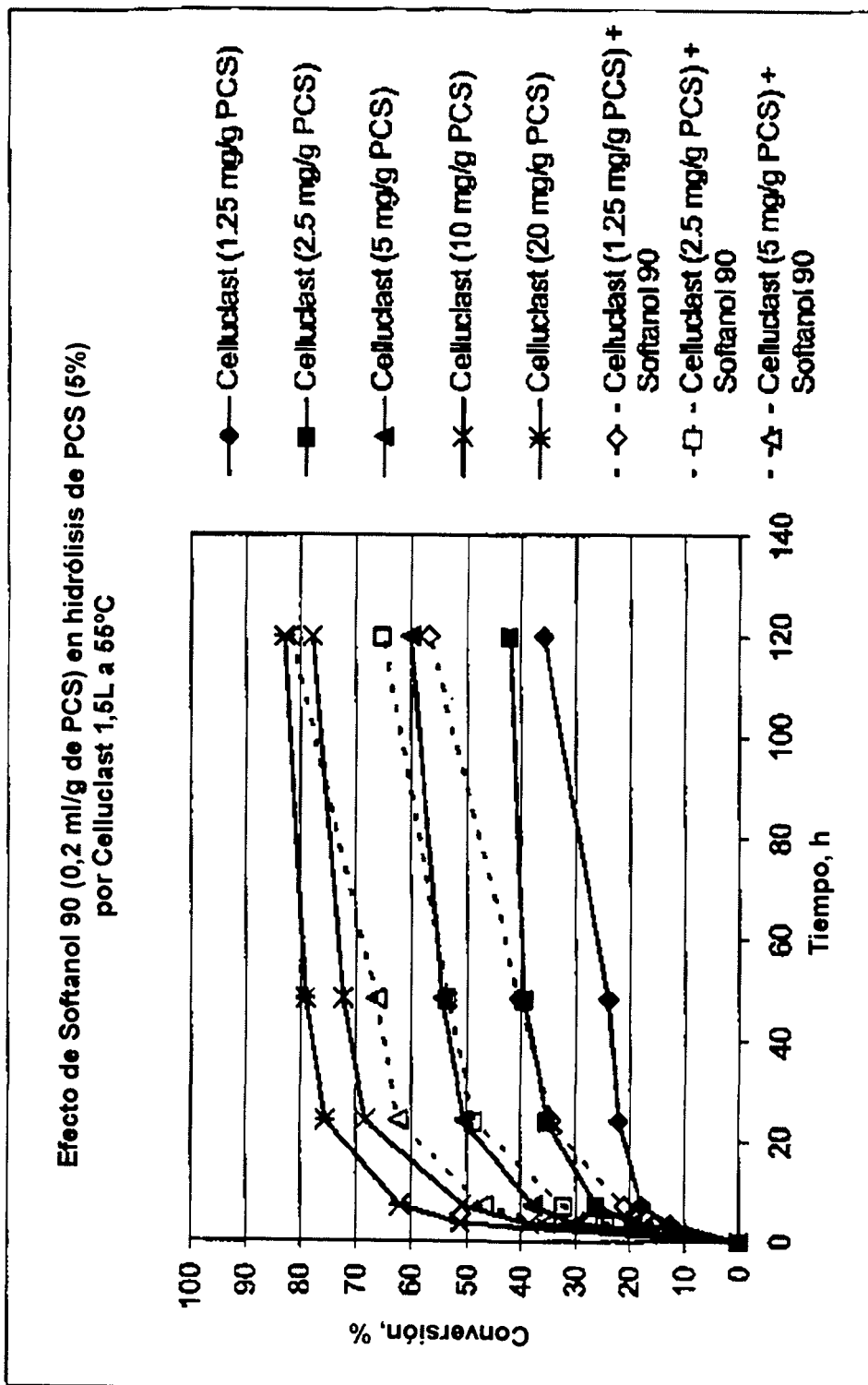


Fig. 20

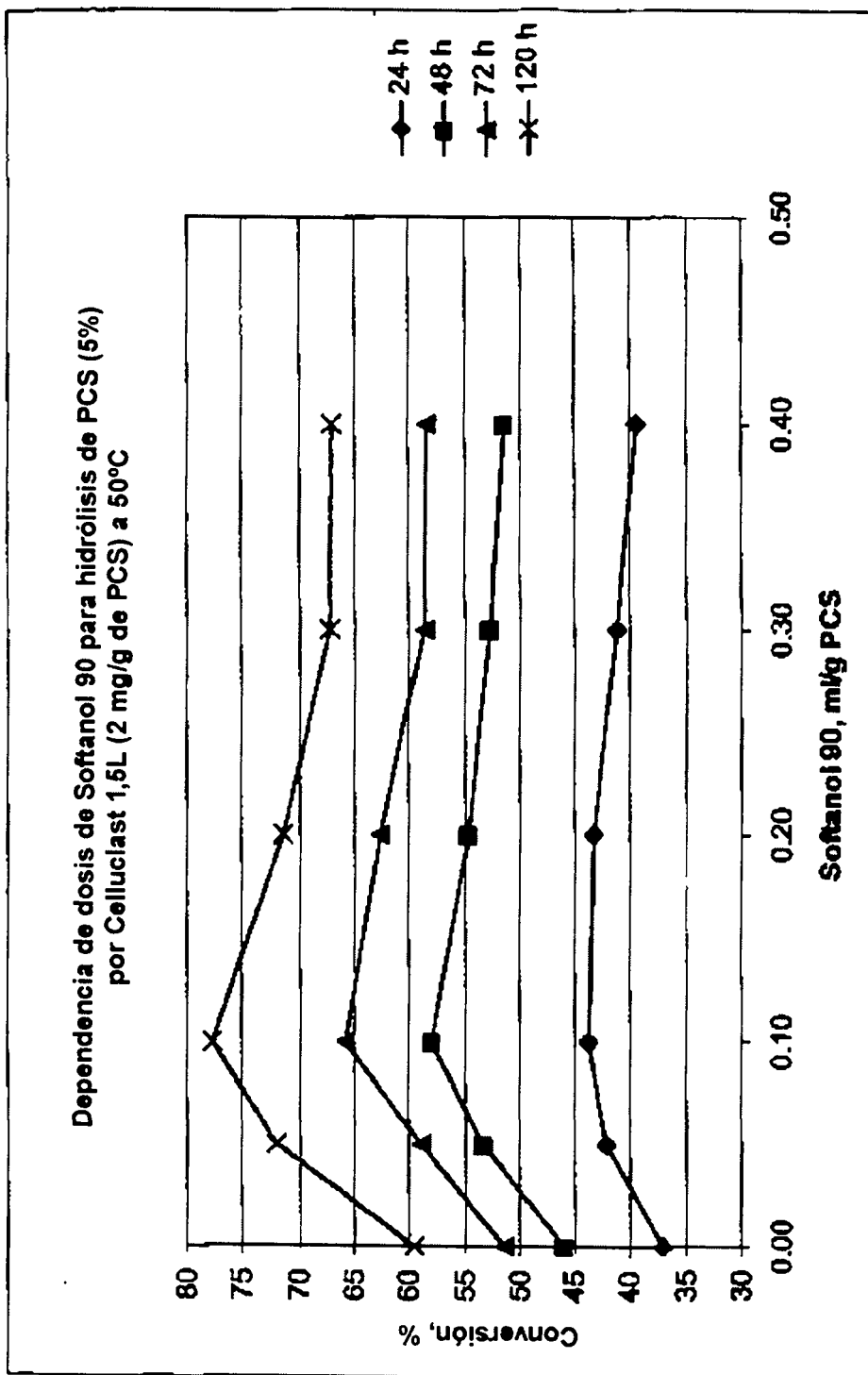


Fig. 21

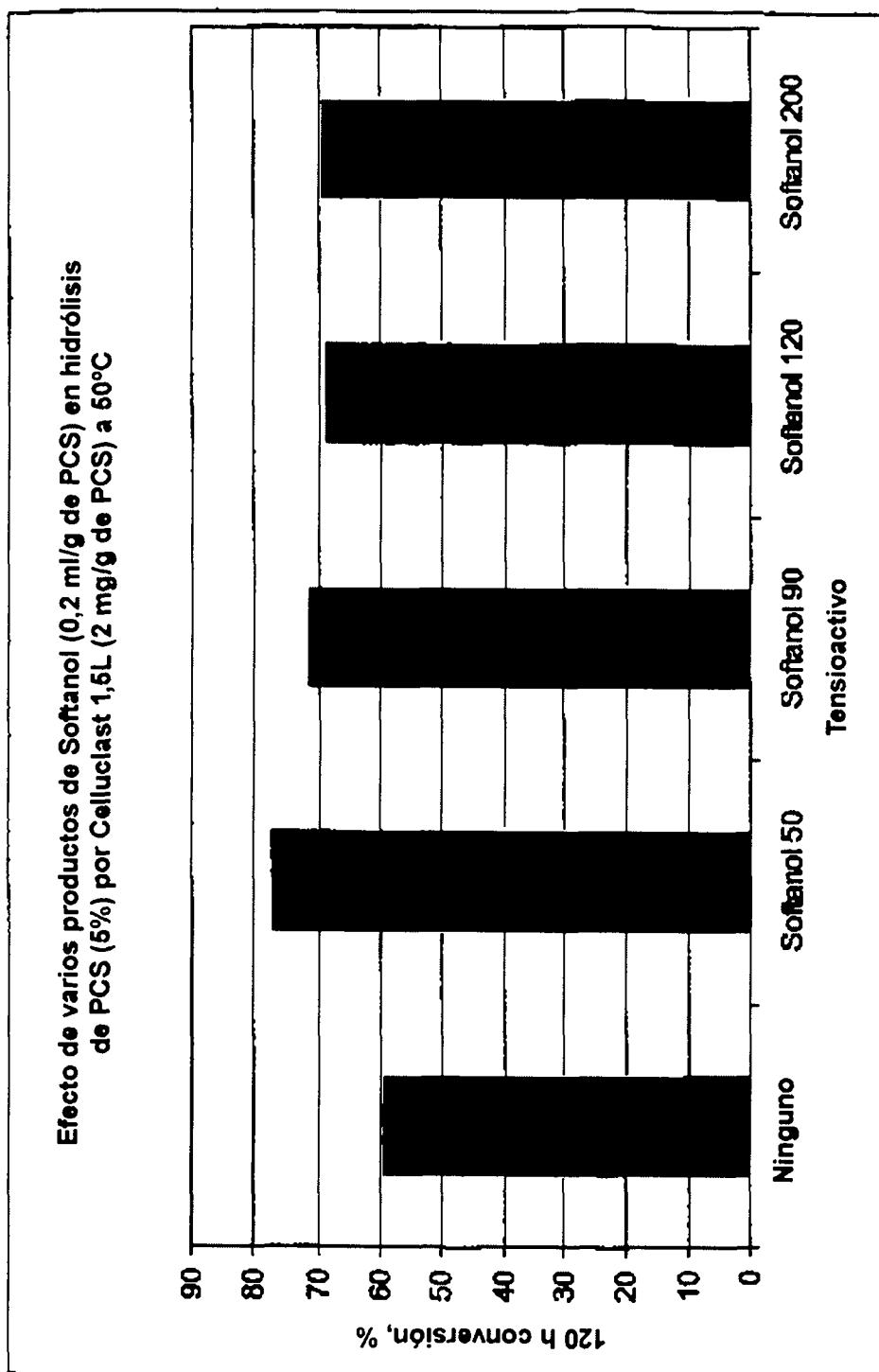


Fig. 22

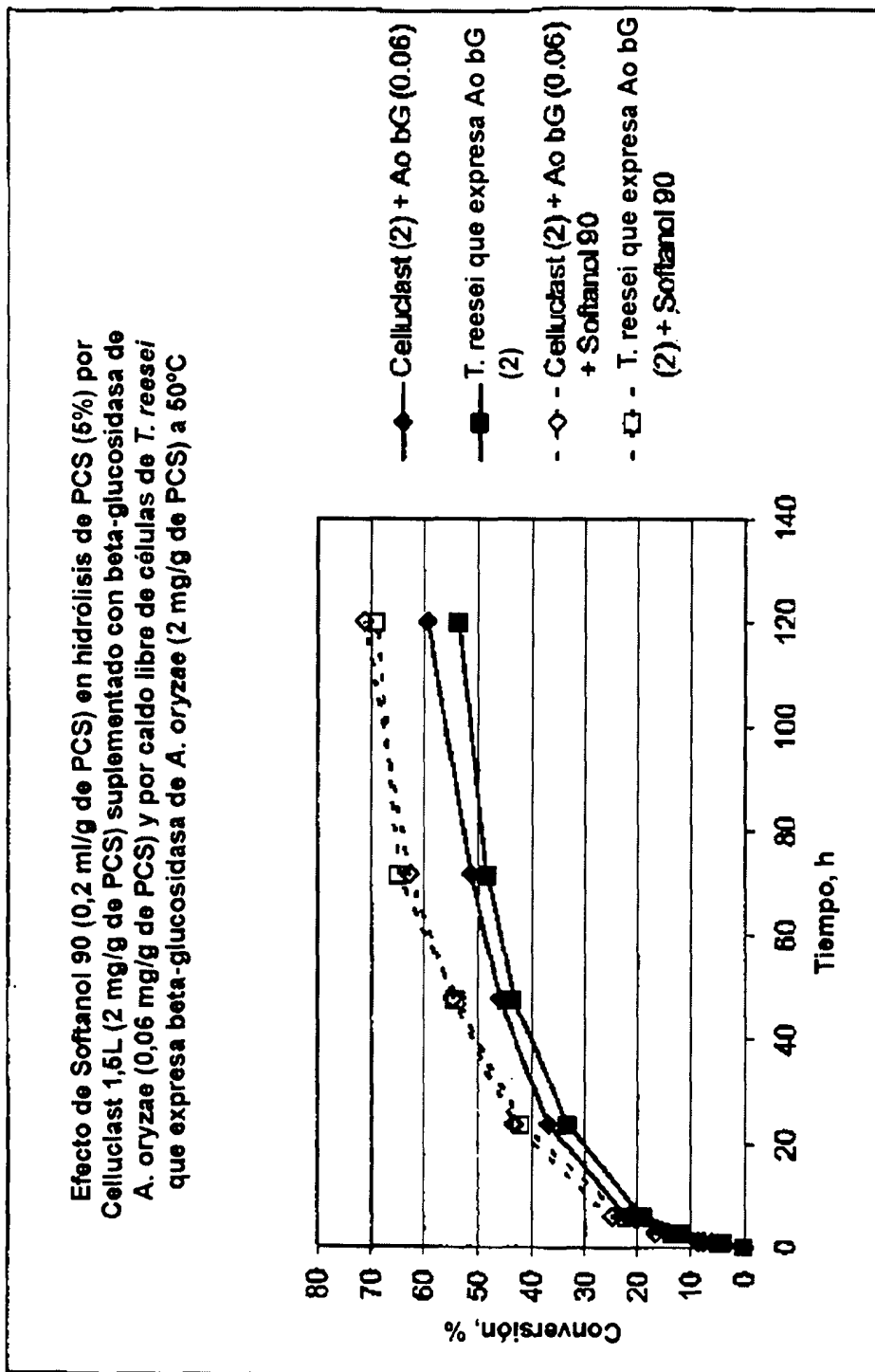


Fig. 23



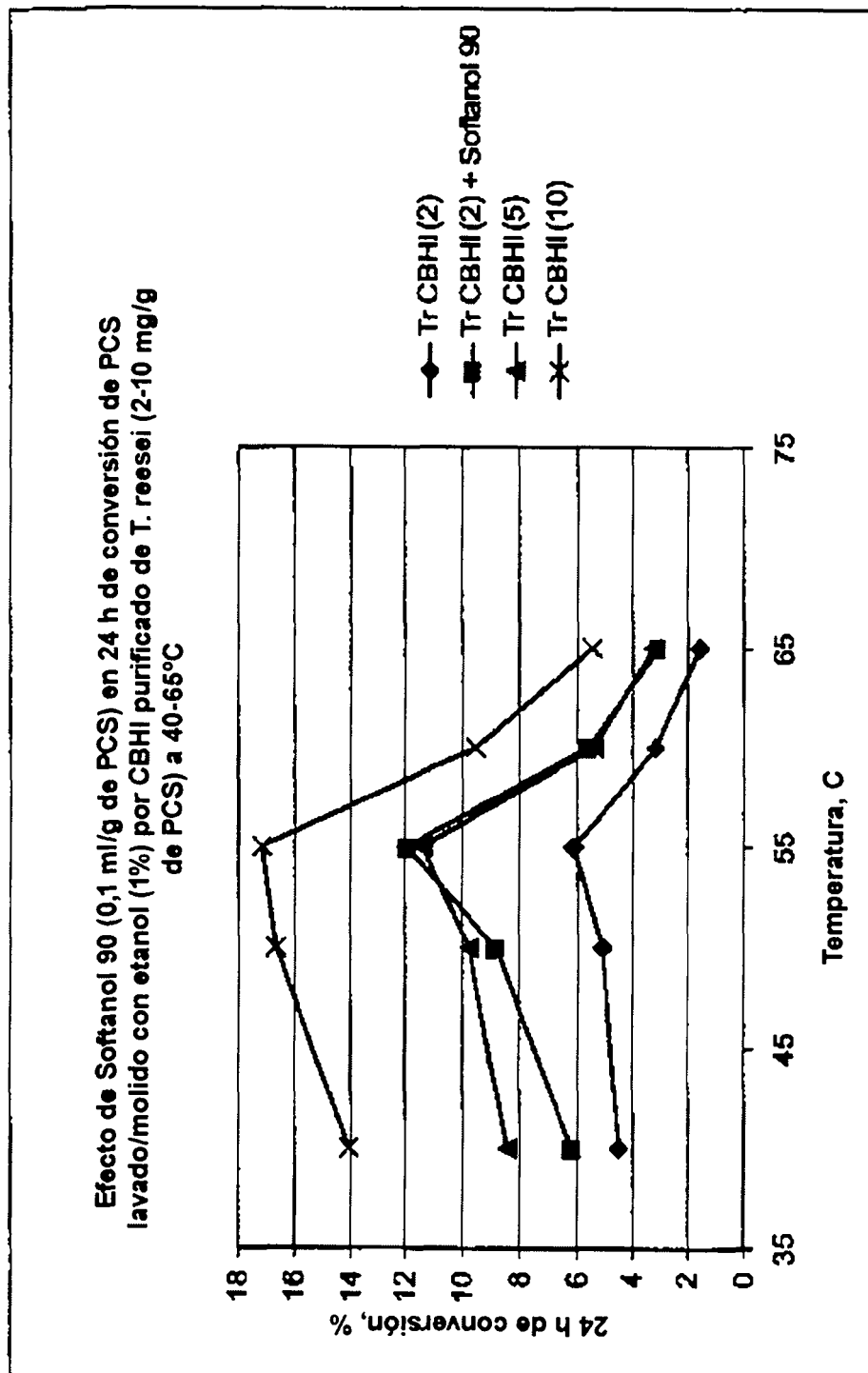


Fig. 24

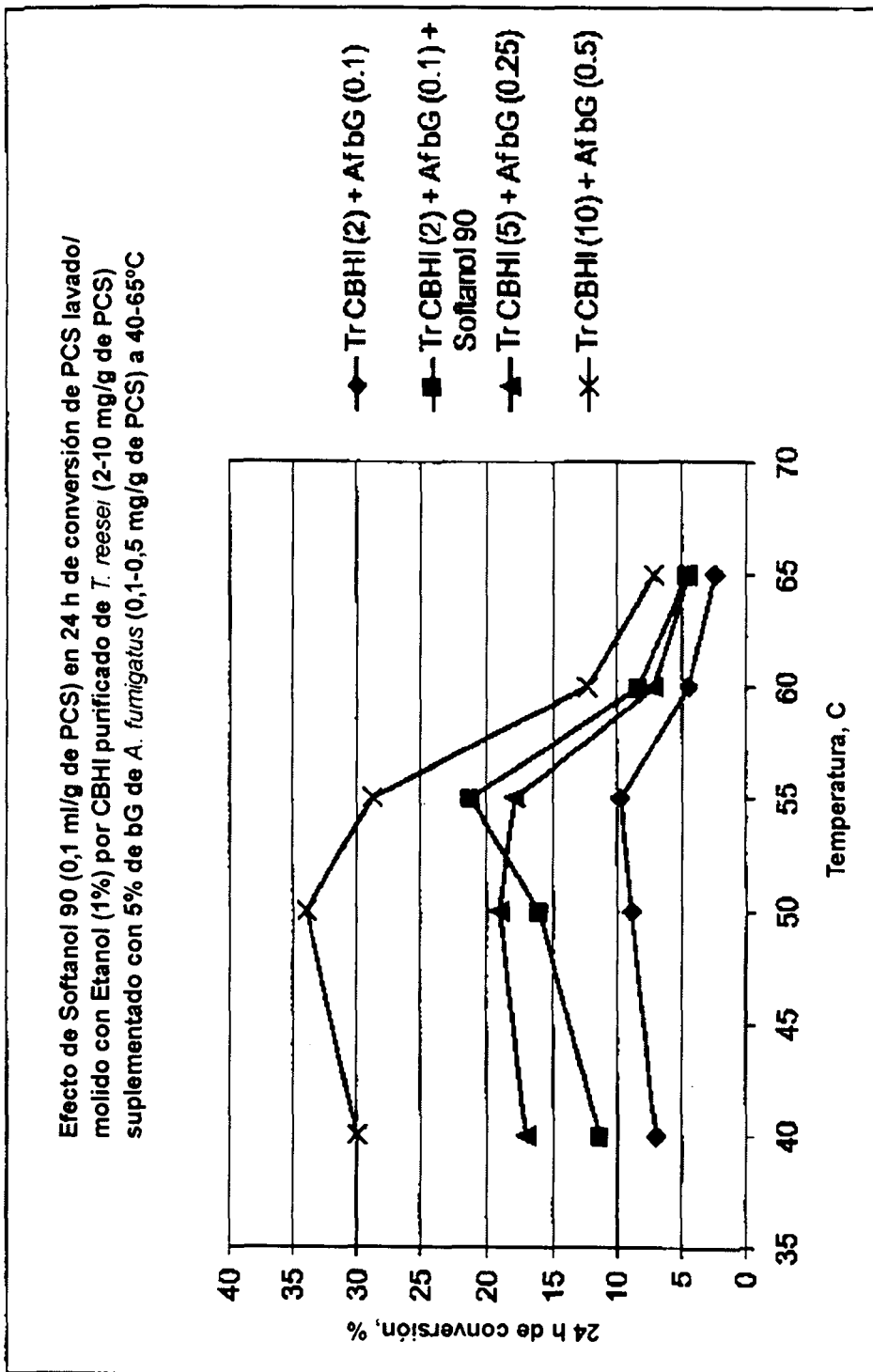


Fig. 25

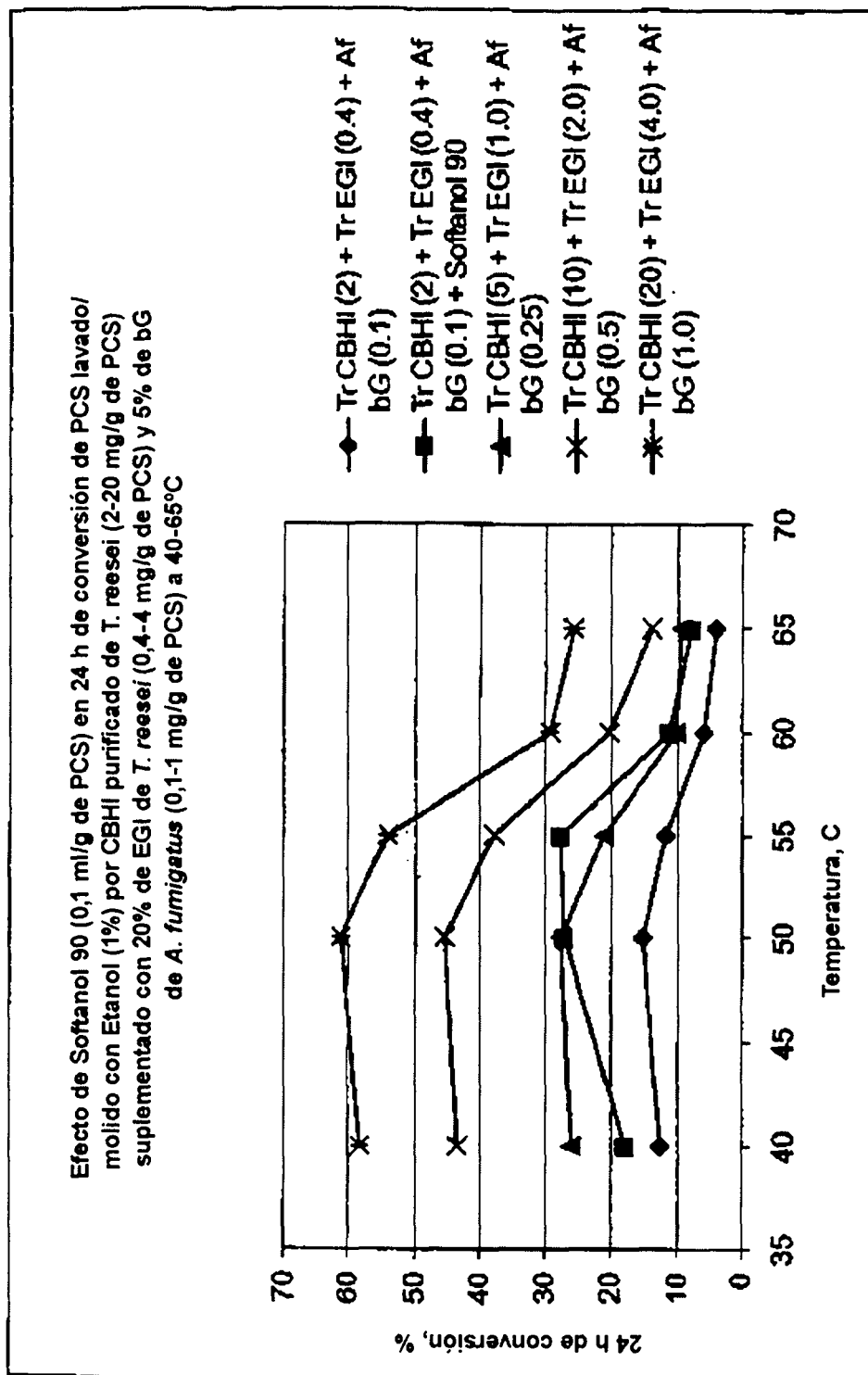


Fig. 26

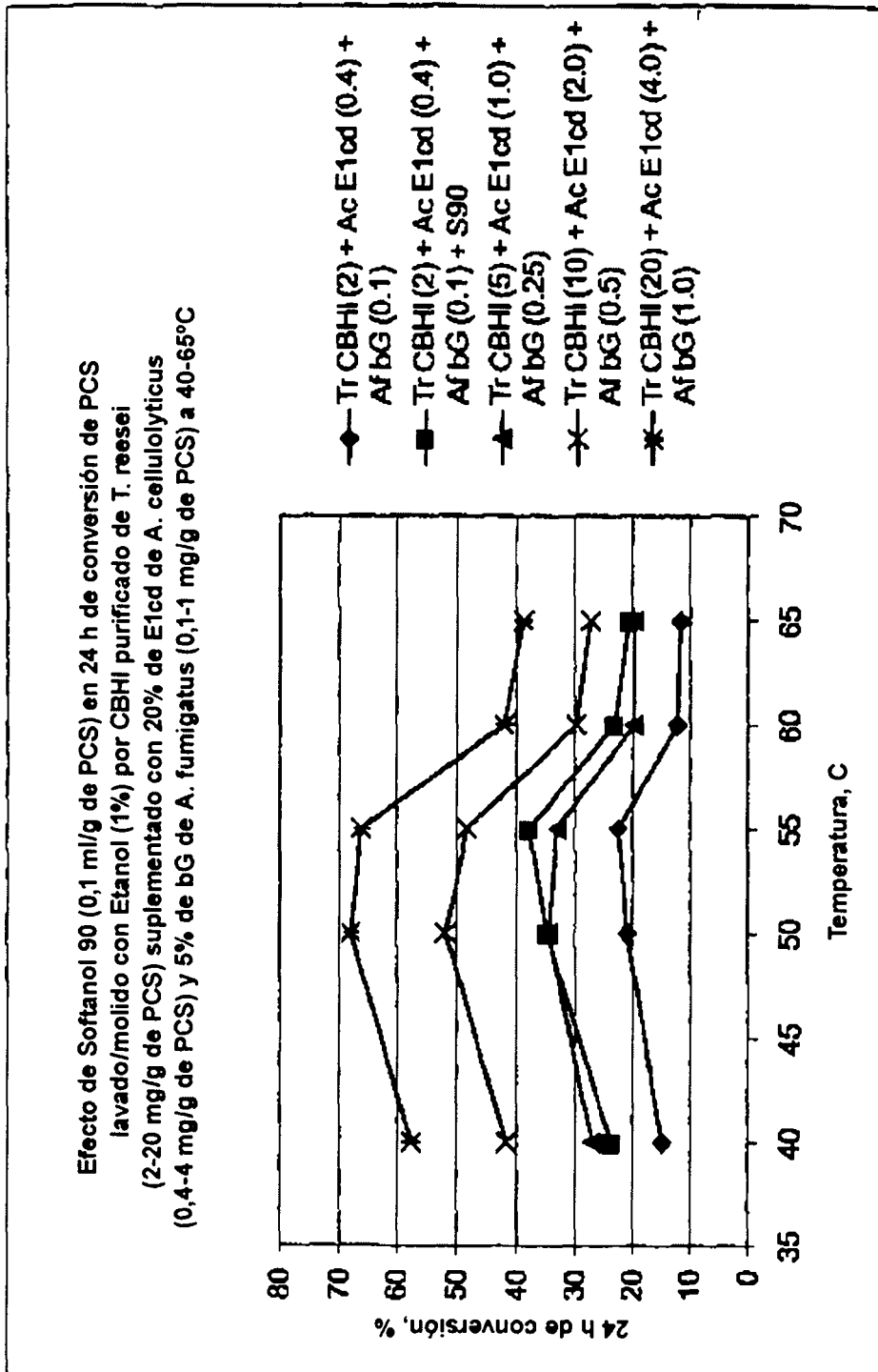


Fig. 27

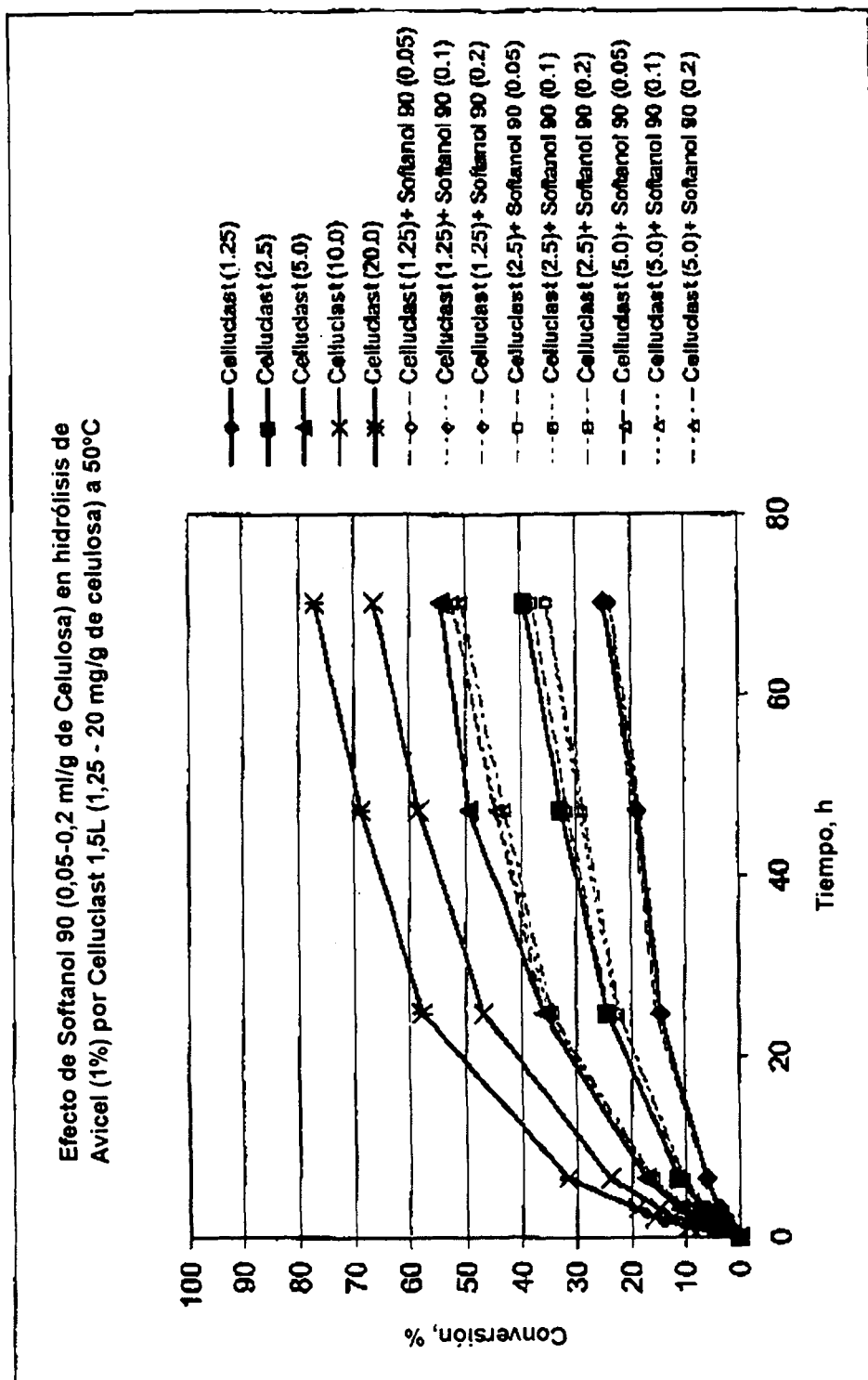


Fig. 28

# ES 2 357 037 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Novozymes Biotech, Inc.	
5	<120> Métodos para degradar materiales lignocelulósicos	
	<130> 10586.204-WO	
10	<150> 60/537,452	
	<151> 2004-01-16	
	<160> 43	
15	<170> PatentIn version 3.2	
	<210> 1	
20	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
25	<400> 1	
	gtgcccattg atagcctcc gg	22
30	<210> 2	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 2	
40	gagtcgtatt tccaaggctc ctgacc	26
	<210> 3	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 3	
50	ggaggccatg aagtgaccca acgg	24
	<210> 4	
55	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus niger</i>	
60	<400> 4	
	caccgtgaaa gccatgctct ttcttcgtg tagaagacca gacag	45
65	<210> 5	
	<211> 45	
	<212> ADN	

## ES 2 357 037 T3

	<i>&lt;213&gt; Aspergillus niger</i>	
	<i>&lt;400&gt; 5</i>	
5	ctggtcttct acacgaagga aagagcatgg ctttcacggt gtctg	45
	<i>&lt;210&gt; 6</i>	
10	<i>&lt;211&gt; 44</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Aspergillus oryzae</i>	
15	<i>&lt;400&gt; 6</i>	
	ctatatacac aactggattt accatgggcc cgcgccgca gatc	44
20	<i>&lt;210&gt; 7</i>	
	<i>&lt;211&gt; 44</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Aspergillus oryzae</i>	
25	<i>&lt;400&gt; 7</i>	
	gatctcggc cgcgggccca tggtaaacc agttgtgat atag	44
30	<i>&lt;210&gt; 8</i>	
	<i>&lt;211&gt; 29</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
35	<i>&lt;213&gt; Trichoderma reesei</i>	
	<i>&lt;400&gt; 8</i>	
40	aacgtaatt aaggaatcgt tttgtgtt	29
	<i>&lt;210&gt; 9</i>	
	<i>&lt;211&gt; 29</i>	
45	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Trichoderma reesei</i>	
	<i>&lt;400&gt; 9</i>	
50	agtactagta gctccgtgac gaaagcctg	29
	<i>&lt;210&gt; 10</i>	
55	<i>&lt;211&gt; 31</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	
	<i>&lt;213&gt; Humicola insolens</i>	
60	<i>&lt;400&gt; 10</i>	
	ttgaattgaa aatagattga tttaaaactt c	31
65	<i>&lt;210&gt; 11</i>	
	<i>&lt;211&gt; 25</i>	
	<i>&lt;212&gt; ADN</i>	

## ES 2 357 037 T3

	<213> <i>Humicola insolens</i>	
	<400> 11	
5	ttgcatgctg aatcatggc atagc	25
	<210> 12	
10	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
15	<400> 12	
	ttgaattcat gggtaataac tgatat	26
20	<210> 13	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
25	<400> 13	
	aaatcaatct atttcaatt caattcatca tt	32
30	<210> 14	
	<211> 45	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 14	
40	ggatgctggt gactccggaa atttaacggt ttggtctgc atccc	45
	<210> 15	
	<211> 44	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>	
	<400> 15	
50	ggattgtcc tgcagacggc aatttaacgg cttctcgaa tcgc	44
	<210> 16	
55	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Humicola insolens</i>	
60	<400> 16	
	aagcttaagc atgcttctct cccccctcc	29
65	<210> 17	
	<211> 32	
	<212> ADN	



## ES 2 357 037 T3

	<213> <i>Humicola insolens</i>	
	<400> 17	
5	ctgcagaatt ctacaggcac tgatgtacc ag	32
	<210> 18	
10	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> <i>Humicola insolens</i>	
15	<400> 18	
	ctgcagaatt ctacaggcac tgatgtacc ag	32
20	<210> 19	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> <i>Humicola insolens</i>	
25	<400> 19	
	accgaggact ggcacatcatg cgttctctccc ccctcc	36
30	<210> 20	
	<211> 29	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 20	
40	aaacgtcgac cgaatgtagg attgttacc	29
	<210> 21	
	<211> 17	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 21	
50	gatgcgcagt cgcggt	17
	<210> 22	
55	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
60	<400> 22	
	aaacgtcgac cgaatgtagg attgttacc	29
65	<210> 23	
	<211> 36	
	<212> ADN	

ES 2 357 037 T3

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 23

5 ggagggggga ggaacgcatg atgcgcagtc cgcggt 36

<210> 24

10 <211> 29

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

15 <400> 24

aaacgtcgac cgaatgtagg attgttat 29

20 <210> 25

<211> 32

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

25 <400> 25

ctgcagaatt ctacagcac tgatgtacc ag 32

30 <210> 26

<211> 57

<212> ADN

35 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 26

40 atgaagcttg gttgatcga ggtggccgca ttggcgctg cctcagtagt cagtgcc 57

<210> 27

<211> 19

45 <212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 27

50 **Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val**

**1 5 10 15**

55 **Val Ser Ala**

<210> 28

<211> 42

60 <212> ADN

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 28

65 tgccggtgtt ggccctgcc aaggatgac tgcgtactc cc 42

ES 2 357 037 T3

<210> 29  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 5 <213> *Aspergillus oryzae*  
 <400> 29  
 10 gactagtctt actgggcctt aggcagcg 28  
 <210> 30  
 <211> 63  
 15 <212> ADN  
 <213> *Humicola insolens*  
 <400> 30  
 20  
 atgagtctct cccccctct cagctcagcc gttgtggcag cactgacggt gttggccatt 50  
 gcc 63  
 25  
 <210> 31  
 <211> 21  
 30 <212> PRT  
 <213> *Humicola insolens*  
 <400> 31  
 35  
 Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro  
 1 5 10 15  
 40  
 Val Leu Ala Leu Ala  
 20  
 45  
 <210> 32  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 50 <213> *Aspergillus oryzae*  
 <400> 32  
 55 acgcgtcgac cgaatgtagg attgttatcc 30  
 <210> 33  
 <211> 42  
 60 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus oryzae*  
 <400> 33  
 65  
 gggagtacgc gagatcatcc ttggcaaggg ccaacaccgg ca 42

ES 2 357 037 T3

<210> 34  
<211> 31  
<212> ADN  
5 <213> *Aspergillus fumigatus*  
  
<400> 34  
10 actggattta ccatgagatt cggttggctc g 31  
  
<210> 35  
<211> 31  
15 <212> ADN  
<213> *Aspergillus fumigatus*  
  
<400> 35  
20 agtcacctct agttactagt agacacgggg c 31  
  
<210> 36  
25 <211> 3060  
<212> ADN  
<213> *Aspergillus fumigatus*  
  
30 <400> 36  
  
Atgagattcg gttggctoga ggtggccgct ctgacggcog cttctgtagc caatgccocag 60  
35 gtttgtgatg ctttcccgte attgbbtcgg atatagttga caatagtcac ggaataatc 120  
aggaattgga tttctctcca ccattotacc cttegccttg ggctgatggc cagggagagt 180  
40 gggcagatgc ccatcgacgc gccgtcgaga tcgtttctca gatgacactg gcggagaagg 240  
ttaaccttac aacgggtact gggtaggttg cgactttttt gttgacagtg agctttcttc 300  
  
45  
  
50  
  
55  
  
60  
  
65

ES 2 357 037 T3

actgaccatc tacacagatg ggaatggac cgatgcgtcg gtcaaaccgg cagcgttccc 360  
 aggtaaagctt gcaattctgc aacaacgtgc aagtgtagtt gctaaaacgc ggtgggtgcag 420  
 5 acttggtatc aactggggtc tttgtggca ggattcccc ttgggtatcc gttctgtga 480  
 gctataccocg cggagtcctt cagtccttctt attatgtgct gatgattgtc tctgtatagc 540  
 10 tgacctcaac tccgccttcc ctgctggtag taatgtcgcc gcgacatggg acaagacact 600  
 cgcctacctt cgtggcaagg ccatgggtga ggaattcaac gacaagggcg tggacatctt 660  
 15 gctggggcct gctgotggtc ctctggca ataccggac ggoggcagaa tctgggaagg 720  
 ctctctctct gatccggttc tcaactgggtt acttttcgcc gaaactatca agggtatcca 780  
 agacgcgggt gtgattgcta ctgccaaagc ttacattctg aatgaacagg agcatttccg 840  
 20 acaggttggc gaggcccccgg gatatggta caacatcacg gagacgatca gctccaaagt 900  
 ggatgacaag accatgcacg agttgtacot ttggtgagta gttgacactg caaatgagga 960  
 25 ccttgattga tttgactgac ctggaatgca ggccctttgc agatgctgtg ccggttaaga 1020  
 ttttccgtag acttgacctc gcgacgaaga aatcgctgac gaaccatcgt agctggcgtt 1080  
 ggcgctgtca tgtgttccca caatcaatc aacaacagct accggttgtca aaacagtcaa 1140  
 30 actotcaaca agctccotcaa ggctgagotg ggcttccaag gcttctgatc gagtgactgg 1200  
 agcgtcacc acagcgggtg cggcgtctgc ctcgctgggt tggatatgtc gatgcctgga 1260  
 35 gacatttccct tcgacgacgg actctccttc tggggcacga acctaaactgt cagtgttctt 1320  
 aacggcaacc ttccagcctg gcgtgtcgat gacatggctg ttctgtatcat gaccgcgtac 1380  
 40 tacanggttg gtcgtgaccg tcttctgtat cccctcaat tcagctcctg gaccgggat 1440  
 gagtadggct gggagcattc tgcctctcc gaggggagct ggaocaaagg gaaocactto 1500  
 gtcaatgtgc agcgcagtca ctctcagatc atccgtgaga ttggtgccgc tagtacagtg 1560  
 45 ctcttgaaga acacgggtgc tcttcccttg accggcaagg aggtttaaagt ggtgttctc 1620  
 ggtgaagacg ctggttccaa cccgtgggtt gctaacggct gccccgacog cggotgtgat 1680  
 50 aacggcacto ttgctatggc ctggggtagt ggtactgcca acttccctta ccttgtacc 1740  
 cccgagcagg ctatccagcg agaggtcac cgcacggcg gcaatgtctt tgctgtgact 1800  
 gataacgggg ctctcagcca gatggcagat gttgcatctc aatccaggtg agtgccggct 1860  
 55 cttagaaaaa gaacgttctc tgaatgaagt ttttkaacca ttgcgaacag cgtgtctttg 1920  
 gtgtttgtca acgcgaactc tggagagggt ttcctcagtg tcgacggca caggggtgac 1980  
 60 cgcacaaatc tcaactctgtg gaaacggc gaggcogtca ttgacactgt tgtcagccac 2040  
 tgcacaaca cgattgtggt tattccaggt gttgggcccg tcttgatcga ccggtggtat 2100

65

ES 2 357 037 T3

5 gataaccccc acgtcactgc catcatctgg gccggcttgc ccggtcagga gagtgggaac 2160  
 tcccrggctg acgtgctcta tggccgcgtc aaccccagcg ccaagacccc gttcacctgg 2220  
 10 ggcaagactc gggagtctta cggggctccc ttgctcaccg agoctaadaa tggcaatggt 2280  
 gctccccagg atgatttcaa cgagggcgtc ttcattgact accgtcactt tgacaagcgc 2340  
 aatgagaccc ccatttatga gtttggccat ggcttgagct acaccacctt tggttactct 2400  
 15 caccttcggg ttcaggccct caatagtctg agttcgscat atgtcccagc tagcggagag 2460  
 accaagcctg cgcacaacct tggtgagatc ggtagtgcg ccgactacct gtatcccag 2520  
 ggtctcaaaa gaattaccaa gtttatctac ccttggctca actcgaccga cctcgaggat 2580  
 20 tcttctgacg acccgaaact cggctgggag gactcggagt acattccoga aggcgctagg 2640  
 gatgggtctc ctcaaccctt cctgaaggct ggccggcgctc ctggtggtaa ccctaccctt 2700  
 25 taccaggatc ttgttagggg gtcggccacc ataaccaaca ctggtaacgt cgcgggttat 2760  
 gaagtccctc aattgggtgag tgaccocgat gttccttggc ttgcaatttg gctaactcgc 2820  
 ttctagtatg tttcaactggg cggaccgaac gagcctcggg tcgttctgcg caagtctgac 2880  
 30 cgaatcttcc tggctcctgg ggagcaaaa gtttggacca cgactcttaa ccgtcgtgat 2940  
 ctgcaccaat gggatgtgga ggctcaggac tgggtcatca caaagtaccc caagaaagt 3000  
 35 cacgtcggca gctcctcggg taagctgcct ctgagagcgc ctctgccccg tgtctactag 3060

40 <210> 37

<211> 863

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

45 <400> 37

Met Arg Phe Gly Trp Leu Glu Val Ala Ala Leu Thr Ala Ala Ser Val  
 1 5 10 15

Ala Asn Ala Gln Glu Leu Ala Phe Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro  
 20 25 30

Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Asp Ala His Arg Arg Ala Val  
 35 40 45

Glu Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr  
 50 55 60

Gly Thr Gly Trp Glu Met Asp Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser Val  
 65 70 75 80

ES 2 357 037 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

Pro Arg Leu Gly Ile Asn Trp Gly Leu Cys Gly Gln Asp Ser Pro Leu  
 85 90 95

Gly Ile Arg Phe Ser Asp Leu Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Asn  
 100 105 110

Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Lys Ala  
 115 120 125

Met Gly Glu Glu Phe Asn Asp Lys Gly Val Asp Ile Leu Leu Gly Pro  
 130 135 140

Ala Ala Gly Pro Leu Gly Lys Tyr Pro Asp Gly Gly Arg Ile Trp Glu  
 145 150 155 160

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

Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr  
 180 185 190

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

Tyr Gly Tyr Asn Ile Thr Glu Thr Ile Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys  
 210 215 220

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

Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr  
 245 250 255

Gly Cys Gln Asn Ser Gln Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu  
 260 265 270

Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Ser Ala His His Ser Gly  
 275 280 285

Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Ile  
 290 295 300

Ser Phe Asp Asp Gly Leu Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Val Ser  
 305 310 315 320

ES 2 357 037 T3

Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val  
 325 330 338

5

Arg Ile Met Thr Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Leu Arg Ile  
 340 345 350

10

Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Trp Glu His  
 355 360 365

15

Ser Ala Val Ser Glu Gly Ala Trp Thr Lys Val Asn Asp Phe Val Asn  
 370 375 380

20

Val Gln Arg Ser His Ser Gln Ile Ile Arg Glu Ile Gly Ala Ala Ser  
 385 390 395 400

25

Thr Val Leu Leu Lys Asn Thr Gly Ala Leu Pro Leu Thr Gly Lys Glu  
 405 410 415

30

Val Lys Val Gly Val Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Pro Trp Gly  
 420 425 430

35

Ala Asn Gly Cys Pro Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met  
 435 440 445

40

Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu  
 450 455 460

45

Gln Ala Ile Gln Arg Glu Val Ile Ser Asn Gly Gly Asn Val Phe Ala  
 465 470 475 480

50

Val Thr Asp Asn Gly Ala Leu Ser Gln Met Ala Asp Val Ala Ser Gln  
 485 490 495

55

Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Phe  
 500 505 510

60

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

65

Lys Asn Gly Glu Ala Val Ile Asp Thr Val Val Ser His Cys Asn Asn  
 530 535 540

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



ES 2 357 037 T3

5 Tyr Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Ile Trp Ala Gly Leu Pro Gly  
565 570 575

10 Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn  
580 585 590

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

20 Gly Ala Pro Leu Leu Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln  
610 615 620

25 Asp Asp Phe Asn Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys  
625 630 635 640

30 Arg Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr  
645 650 655

35 Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser  
660 665 670

40 Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr  
675 680 685

45 Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys  
690 695 700

50 Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu  
705 710 715 720

55 Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile  
725 730 735

60 Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly  
740 745 750

65 Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val  
755 760 765

70 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro  
770 775 780

75 Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu  
785 790 795 800

ES 2 357 037 T3

Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp  
 805 810 815

5 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala  
 820 835 830

10 Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser  
 835 840 845

15 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr  
 850 855 860

20 <210> 38

<211> 26

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

25 <400> 38

actagtcgac cgaatgtagg attggt

26

30 <210> 39

<211> 19

<212> ADN

35 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 39

40 tgaccatggt ggcagctcc

19

<210> 40

<211> 26

45 <212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 40

50 cgatgctctc cctatgggtc attacc

26

<210> 41

55 <211> 28

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

60 <400> 41

actagttaat taagctccgt ggcgaaag

28

65 <210> 42

<211> 29

## ES 2 357 037 T3

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

5 <400> 42

cttcacatg gcgccctcag ttacactgc

29

10 <210> 43

<211> 33

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

15

<400> 43

gccgtaatt aaggcaagtc aacgctctaa agg

33

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65