

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 442**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05726395 .6**

96 Fecha de presentación: **04.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1733033**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de aumento celulolítica y polinucleótidos que los codifican**

30 Prioridad:
06.02.2004 US 542614 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2012

73 Titular/es:
NOVOZYMES INC. (100.0%)
1445 DREW AVENUE
DAVIS, CA 95616, US

72 Inventor/es:
DOTSON, WILLIAM;
GREENIER, JENNIFER y
DING, HANSHU

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

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).

ES 2 389 442 T3

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de aumento celulolítica y polinucleótidos que los codifican

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de aumento celulolítica y polinucleótidos aislados al azar, abriéndolas para atacar con celobiohidrolasas. Las celobiohidrolasas liberan secuencialmente moléculas de celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero hidrosoluble beta-1,4-unido de glucosa. Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa a glucosa. Estas enzimas han sido clonadas y expresadas de manera recombinante (*Saloheimo et al. Eur.J. Biochem. 249, 584-591 (1997)*).

10

Descripción de las técnicas relacionadas

[0002] La celulosa es un polímero de la glucosa de azúcar simple unida de manera covalente por enlaces beta-1,4. Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos beta-unidos. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas. Las endoglucanasas digieren los polímeros de celulosa en lugares al azar, abriéndolas para atacar con celobiohidrolasas. Las celobiohidrolasas liberan secuencialmente moléculas de celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero hidrosoluble beta-1,4-unido de glucosa. Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa a glucosa. Estas enzimas han sido clonadas y expresadas de manera recombinante (*Saloheimo et al. Eur.J. Biochem. 249, 584-591 (1997)*).

15

20

[0003] La conversión de materias primas celulósicas en etanol tiene las ventajas de la disponibilidad rápida de grandes cantidades de materia prima, la conveniencia de evitar la quema o el llenado de tierra de los materiales y la limpieza del combustible de etanol. Madera, residuos agrícolas, cultivos herbáceos y desperdicios sólidos municipales han sido considerados como materias primas para producción de etanol. Estos materiales principalmente consisten en celulosa, hemicelulosa y lignina. Una vez la celulosa se convierte a glucosa, la glucosa es fermentada fácilmente por levadura en etanol.

25

[0004] Sería ventajoso en la técnica para mejorar la conversión de materias primas celulósicas.

30

[0005] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos aislados con actividad de aumento celulolítica y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos para mejorar la conversión de materias primas celulósicas.

Resumen de la invención

35

[0006] La presente invención se refiere en un primer aspecto a polipéptido aislado con actividad de aumento celulolítica, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2 y

(b) un polipéptido que es codificado por un polinucleótido que hibrida bajo al menos condiciones de astringencia altas con (i) los nucleótidos 67 a 796 de la SEC ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 67 a 796 de la SEC ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).

40

[0007] La presente invención también se refiere en un segundo aspecto a polinucleótidos aislados comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del primer aspecto, al igual que a una planta, parte de planta o célula vegetal, que ha sido transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido del primer aspecto.

45

[0008] La presente invención también se refiere en unos terceros aspectos a una construcción de ácidos nucleicos comprendiendo el polinucleótido del segundo aspecto operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en una célula huésped, esta célula huésped es una célula huésped no humana.

50

[0009] La invención también se refiere a un vector de expresión recombinante comprendiendo la construcción de ácidos nucleicos del tercer aspecto, a una célula huésped recombinante no humana comprendiendo la construcción de ácidos nucleicos del tercer aspecto.

55

[0010] La invención también se refiere a un método para la producción del polipéptido del primer aspecto comprendiendo: (a) cultivo de una célula huésped no humana comprendiendo una construcción de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

60

[0011] La invención también se refiere a un método para la producción del polipéptido del primer aspecto, comprendiendo: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido con actividad de aumento celulolítica bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

65

[0012] Finalmente la invención también se refiere a un método para degradación o conversión de un material celulósico, comprendiendo: tratamiento del material celulósico con una cantidad eficaz de una proteína celulolítica en presencia de una cantidad eficaz del polipéptido con actividad de aumento celulolítica del primer aspecto, donde la presencia del

polipéptido con actividad de aumento celulolítica aumenta la degradación de material celulósico en comparación con la ausencia del polipéptido con actividad de aumento celulolítica.

Breve descripción de las figuras

[0013]

La Figura 1 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de una actividad de aumento celulolítica de *Termoascus aurantiacus* (SEC ID n°: 1 y 2, respectivamente). Intrones predichos están en cursiva. El péptido señal (SignalP) previsto está subrayado. La secuencia codificante es 799 pares de bases que incluye el codón de terminación y se interrumpe por un intrón de 56 pares de bases. El polipéptido maduro previsto contiene

228 aminoácidos.

La Figura 2 muestra un mapa de restricción de pAIló1.

La Figura 3 muestra un mapa de restricción de pBAné10.

La Figura 4 muestra un mapa de restricción de pAIló2.

La Figura 5 muestra un mapa de restricción de pDZA2.

Definiciones

[0014] Actividad de aumento celulolítica: el término "actividad de aumento celulítica" es definida aquí como una actividad biológica que mejora la hidrólisis de un material celulósico por proteínas con actividad celulolítica. Para fines de la presente invención, actividad de aumento celulolítica se determina por medición del aumento en azúcares reductores a partir de la hidrólisis de un material celulósico con proteína celulolítica bajo las siguientes condiciones: 5,0 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS durante 5-7 días a 50°C en presencia y ausencia de 0,01-2,5 mg de actividad de aumento celulolítica por g de celulosa en PCS en comparación con una hidrólisis de control con la misma de carga de proteína total sin actividad de aumento celulolítica (5,01-7,5 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS). En un aspecto preferido, una preparación con celulasa derivada de fermentación de *Trichoderma reesei* expresando una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 02/095014), de ahora en adelante llamada Tr/AoBG y obtenida de Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca, de carga de proteína de celulasa se usa como la fuente de la actividad celulolítica.

[0015] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, de forma más preferida al menos 95%, e incluso de forma más preferida al menos 100% de la actividad de aumento celulolítica del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2.

[0016] Material celulósico: el término "material celulósico" es definido aquí como cualquier material con celulosa. La celulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, vainas, cáscaras y mazorcas de plantas u hojas, ramas y madera de árboles. El material celulósico puede también ser, pero no está limitado a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, desperdicios sólidos municipales, papel usado y pulpa y residuos de fábrica de papel. Se entiende aquí que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un material de pared celular vegetal con lignina, celulosa y hemicelulosa en una matriz mezclada.

[0017] En un aspecto preferido, el material celulósico es restos de maíz. En otro aspecto preferido, el material celulósico es fibra de maíz. En otro aspecto preferido, el material celulósico es paja de arroz. En otro aspecto preferido, el material celulósico es residuos de tratamiento de papel y de pulpa. En otro aspecto preferido, el material celulósico es plantas boscosas o herbáceas. En otro aspecto preferido, el material celulósico es bagazo.

[0018] El material celulósico se puede utilizar como es o se puede someter a pretratamiento, usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, técnicas físicas de pretratamiento pueden incluir varios tipos de fresado, irradiación, explosión por vapor e hidrotermólisis; técnicas químicas de pretratamiento pueden incluir ácido diluido, solvente alcalino orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono, y hidrotermólisis con pH controlado; y técnicas biológicas de pretratamiento pueden implicar aplicación de microorganismos de solubilización de lignina (ver, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, *Pretreatment of biomass*, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., and 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., and 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; Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B., 1996, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*, *Enz. Microb. Tech.* 18: 312-331; y Vallander, L., and Eriksson, K.-E. L., 1990, *Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art*, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 42: 63-95.).

[0019] **Actividad celulolítica:** el término "actividad celulolítica" es definida aquí como una actividad biológica que hidroliza un material celulósico. Para fines de la presente invención, actividad celulolítica se determina por medición del aumento en la hidrólisis de un material celulósico por una mezcla celulolítica bajo las siguientes condiciones: 1-10 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS durante 5-7 días a 50°C en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína celulolítica. En un aspecto preferido, una preparación con celulasa derivada de fermentación de

Trichoderma reesei expresando una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 02/095014), de ahora en adelante llamada Tr/AoBG y obtenida de Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca, de carga de proteína de celulasa se usa como la fuente de la actividad celulolítica.

5 [0020] **Restos de maíz tratados previamente:** el término "restos de maíz pretratados" o "PCS" se define aquí como un material celulósico derivado de restos de maíz por tratamiento con calor y ácido diluido. Para fines de la presente invención, PCS se hace por el método descrito en el ejemplo 9, o variaciones de este en tiempo, temperatura y cantidad de ácido.

10 [0021] **Glucósido hidrolasa de la familia 61:** el término "glucósido hidrolasa de la familia 61" o "familia GH61" se define aquí como un polipéptido que entra en la familia de glucósido hidrolasa 61 según B. Henrissat, 1991, *A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities*, *Biochem. J.* 280: 309-316, y Henrissat B., and Bairoch A., 1996, *Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases*, *Biochem. J.* 316: 695-696. Actualmente, Henrissat enumera la familia GH61 como sin clasificar indicando que propiedades tales como mecanismo nucleófilo/base catalítico, donantes de protón catalíticos y estructura 3-D no se conocen para polipéptidos de esta familia.

[0022] **Polipéptido aislado:** el término "polipéptido aislado" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que es al menos 20% puro, preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro, de forma más preferida al menos 90% puro, e incluso de forma más preferida al menos 95% puro, como determinado por SDS-PAGE.

25 [0023] **Polipéptido substancialmente puro:** el término "polipéptido substancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, más preferiblemente como mucho 3%, incluso más preferiblemente como mucho 2%, de forma más preferida como mucho 1%, e incluso de forma más preferida como mucho 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual es originalmente asociado. Es, por lo tanto, preferido que el polipéptido substancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, más preferiblemente al menos 98% puro, incluso más preferiblemente al menos 99%, de forma más preferida al menos 99,5% puro, e incluso de forma más preferida 100% puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación.

35 [0024] Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptido esté esencialmente libre de otro material de polipéptido con el cual es originalmente asociada. Esto puede lograrse, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

40 [0025] Aquí, el término "polipéptido substancialmente puro" es sinónimo con los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

[0026] **Identidad:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

45 [0027] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por algoritmo blastp (Higgins, 1989, *CABIOS* 5: 151-153), usando el software Paracel BioView Workbench (Paracel, Pasadena, CA) con una matriz blosum62. Penalizaciones de espacio, existencia: 11, y extensión:1, fueron empleados como parámetros de alineamiento por parejas.

50 [0028] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina por el método Wilbur-Lipman (Wilbur and Lipman, 1983, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80: 726-730) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiples: penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineamiento por parejas son Ktuple=3, penalización de espacio=3 y ventanas=20.

55 [0029] **Fragmento de polipéptido:** el término "fragmento de polipéptido" se define aquí como un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminado del amino y/o carboxi terminal de los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2, o una secuencia homóloga de esta, donde el fragmento tiene actividad de aumento celulolítica. Preferiblemente, un fragmento de los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2 contiene al menos 175 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 190 residuos de aminoácidos y de forma más preferida al menos 205 residuos de aminoácidos.

60 [0030] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" se define aquí como una secuencia de nucleótidos con uno o más nucleótidos eliminados del 5' y/o 3' final de los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID n°: 1, o una secuencia homóloga de esta, donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido con actividad de aumento celulolítica. Preferiblemente,

una subsecuencia de los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID nº: 1 contiene al menos 525 nucleótidos, más preferiblemente al menos 570 nucleótidos y de forma más preferida al menos 615 nucleótidos.

- 5 [0031] **Variante alélica:** el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de dos o formas más alternativas de un gen que ocupa el mismo *locus* cromosómico. Variación alélica surge naturalmente a través de mutación y puede suponer polimorfismo dentro de poblaciones. Mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.
- 10 [0032] **Polinucleótido aislado:** el término "polinucleótido aislado" como se usa aquí se refiere a un polinucleótido que es al menos 20% puro, preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro, de forma más preferida al menos 90% puro, e incluso de forma más preferida al menos 95% puro, como determinado por electroforesis de agarosa.
- 15 [0033] **Polinucleótido substancialmente puro:** el término "polinucleótido substancialmente puro" como se usa aquí se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos indeseados o extraños y en una forma adecuada para uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente creada. Así, un polinucleótido substancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, más preferiblemente como mucho 3%, incluso
- 20 más preferiblemente como mucho 2%, de forma más preferida como mucho 1%, e incluso de forma más preferida como mucho 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el cual es originalmente asociado. Un polinucleótido substancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones 5' y 3' no codificantes de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido substancialmente puro sea al menos 90% puro, preferiblemente al menos 92% puro, más preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro,
- 25 más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, incluso más preferiblemente al menos 98% puro, de forma más preferida al menos 99%, e incluso de forma más preferida al menos 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos descritos aquí estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polinucleótida esté esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual es originalmente asociada. Aquí, el término "polinucleótido substancialmente puro" es sinónimo de los términos "polinucleótido aislado" y
- 30 "polinucleótido en forma aislada". Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de estos.
- [0034] **ADNc:** el término "ADNc" es definido aquí como una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula madura dividida de ARNm obtenida de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias de intrón que están presentes normalmente en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primario es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm maduro dividido. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrones por un proceso llamado empalme. ADNc derivado de ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrones.
- 40 [0035] **Construcción de ácidos nucleicos:** el término "construcción de ácidos nucleicos" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien mono- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos en una manera que de otra manera no existirían en la naturaleza. El término construcción de ácidos nucleicos es sinónimo de el término "casete de expresión" cuando la
- 45 construcción de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.
- [0036] **Secuencia de control:** el término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o extranjero o nativo entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia guía de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con motivo de introducir sitios de restricción específicos que
- 50 facilitan ligadura de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.
- [0037] **Operativamente unido:** el término "operativamente unido" denota aquí una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada en relación a la secuencia de codificación de la secuencia polinucleótida tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.
- 60 [0038] **Secuencia codificante:** cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los bordes de la secuencia codificante son generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y termina con un codón de terminación
- 65

tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN, ADNc, o secuencia de nucleótidos recombinante.

[0039] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0040] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" se define aquí como una molécula ADN circular o lineal que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y que se une operativamente a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

[0041] **Célula huésped:** el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo celular que es susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con una construcción de ácidos nucleicos o vector de expresión comprendiendo un polinucleótido de la presente invención.

[0042] **Modificación:** el término "modificación" significa aquí cualquier modificación química del polipéptido comprendiendo o consistiendo en los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2, o una secuencia homóloga de esta, al igual que manipulación genética del ADN que codifica el polipéptido. La modificación puede ser sustituciones, deleciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos al igual que sustituciones de una o más cadenas laterales de aminoácidos.

[0043] **Variante artificial:** cuando se usa aquí, el término "variante artificial" significa un polipéptido con actividad de aumento celulolítica producido por un organismo expresando una secuencia de nucleótidos modificada de la SEC ID n°: 1, o una secuencia homóloga de esta, o la región de codificación madura de esta. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana por modificación de la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC ID n°: 1, o una secuencia homóloga de esta, o la región de codificación madura de esta.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de aumento celulolítica

[0044] En un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad para los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2 (es decir, el polipéptido maduro) de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, incluso más preferiblemente al menos 90%, de forma más preferida al menos 95%, e incluso de forma más preferida al menos 97%, 98%, o 99%, que tienen actividad de aumento celulolítica (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en diez aminoácidos, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, incluso más preferiblemente en tres aminoácidos, de forma más preferida en dos aminoácidos, e incluso de forma más preferida en un aminoácido de los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2.

[0045] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2 o una variante alélica de esta; o un fragmento de esta que tiene actividad de aumento celulolítica. En un aspecto preferido, un polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido comprende los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2, o una variante alélica de esta; o un fragmento de esta que tiene actividad de aumento celulolítica. En otro aspecto preferido, un polipéptido comprende los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2 o una variante alélica de esta; o un fragmento de esta que tiene actividad de aumento celulolítica. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2 o una variante alélica de esta; o un fragmento de esta que tiene actividad de aumento celulolítica. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en los aminoácidos 23 a 250 de las SEC ID n°: 2.

[0046] En un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de aumento celulolítica que es codificada por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia altas y condiciones de astringencia preferiblemente muy altas con (i) los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID n°: 1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria de (i); (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York*). Una subsecuencia de la SEC ID n°: 1 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos. Por otra parte, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad de aumento celulolítica.

[0047] La secuencia de nucleótidos de la SEC ID n°: 1 o una subsecuencia de esta; así como la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2 o un fragmento de esta, se pueden utilizar para diseñar una sonda de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos con actividad de aumento celulolítica de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el genómico o ADNc del género o especie de interés, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar, identificación y aislamiento del gen correspondiente en este. Estas sondas pueden ser

considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser al menos 14, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35, y de forma más preferida al menos 70 nucleótidos en longitud. No obstante, es preferido que la sonda de ácidos nucleicos sea al menos 100 nucleótidos en longitud. Por ejemplo, la sonda de ácidos nucleicos puede ser al menos 200 nucleótidos, preferiblemente al menos 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos, o de forma más preferida al menos 500 nucleótidos en longitud. Sondas incluso más largas pueden ser utilizadas, por ejemplo, sondas de ácidos nucleicos que son al menos 550 nucleótidos, al menos preferiblemente al menos 600 nucleótidos, más preferiblemente al menos 650 nucleótidos, o de forma más preferida al menos 700 nucleótidos en longitud. Ambas sondas de ADN y ARN pueden ser usadas. Las sondas son típicamente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina, o avidina). Estas sondas son abarcadas por la presente invención.

[0048] Un ADN genómico o genoteca de ADNc obtenido a partir de estos otros organismos puede, por lo tanto, ser seleccionado para ADN que hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido con actividad de aumento celulolítica. Genómico u otro ADN de estos otros organismos se puede separar por electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, u otras técnicas de separación. ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizado en la nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Par identificar un clon o ADN que es homólogo a la SEC ID n°: 1, o una subsecuencia de esta, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

[0049] Para fines de la presente invención, hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada correspondiente a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID n°: 1, la secuencia de ADNc contenida en la SEC ID n°: 1, su cadena complementaria, o una subsecuencia de esta, bajo condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas. Moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibrida bajo estas condiciones pueden ser detectadas usando película radiográfica.

[0050] En un aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEC ID n°: 2, o una subsecuencia de esta. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la SEC ID n°: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la región de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID n°: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia de ácidos nucleicos contenida en el plásmido pDZA2-7 que está contenida en *Escherichia coli* NRRL B-30704, donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido con actividad de aumento celulolítica. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la región de codificación de polipéptido maduro contenida en el plásmido pDZA2-7 que está contenida en *Escherichia coli* NRRL B-30704.

[0051] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos en longitud, condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas son definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cortado, y bien 25% de formamida para astringencias bajas y muy bajas, 35% de formamida para astringencias medias y medias altas, o 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0052] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos en longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces cada vez durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y más preferiblemente al menos a 70°C (astringencia muy alta).

[0053] Para sondas cortas que son aproximadamente de 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos en longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación y lavado post-hibridación de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, solución de Denhardt 1X, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP, y 0,2 mg de ARN de levadura por ml seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0054] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos en longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% de SDS durante 15 minutos y dos veces cada vez durante 15 minutos usando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

[0055] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a variantes artificiales comprendiendo una substitución conservadora, eliminación y/o inserción de uno o más aminoácidos de la SEC ID n°: 2 o una secuencia homóloga de esta; o el polipéptido maduro de esta. Preferiblemente, cambios de aminoácidos son de naturaleza secundaria, que es sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al pliegue y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxi- terminal, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido de enlace de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita purificación por cambio de carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

- [0056] Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins, Academic Press, New York*. Los cambios que ocurren con más frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.
- [0057] Además de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) se pueden sustituir para residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no son codificados por el código genético y aminoácidos no naturales se pueden sustituir para residuos de aminoácidos. "Aminoácidos no naturales" han sido modificados después de síntesis de proteína y/o tienen una estructura química en sus cadena(s) lateral diferente de los aminoácidos estándar. Aminoácidos no naturales pueden ser sintetizados químicamente, y preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido piperídico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.
- [0058] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico-químicas de los polipéptidos son alteradas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.
- [0059] Aminoácidos esenciales en el polipéptido progenitor se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081- 1085). En esta técnica, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (es decir, actividad de aumento celulolítica) para identificar residuos de aminoácidos que son muy importantes para la actividad de la molécula. Ver también, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o etiquetado por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativos. Ver, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306- 312; Smith *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Las identidades de aminoácidos esenciales pueden también ser inferidas por análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con un polipéptido según la invención.
- [0060] Sustituciones de aminoácidos múltiples o únicas puede hacerse y evaluarse usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como aquellos descritos por eidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que pueden ser usados incluyen PCR con tendencia al error, visualización de fago (p. ej., Lowman *et al.*, 1991, *Biochem.* 30: 10832-10837; patente US n°. 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46: 145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7: 127).
- [0061] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados mutagenizados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y rápidamente secuenciar usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.
- [0062] El número total de sustituciones de aminoácido, delecciones y/o inserciones de los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2 es 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente 5, más preferiblemente 4, incluso más preferiblemente 3, de forma más preferida 2, e incluso de forma más preferida 1.

Fuentes de polipéptidos con actividad de aumento celulolítica

- [0063] Un polipéptido de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos se produce por la fuente o por una cepa en la que la secuencia de nucleótidos de la fuente ha sido insertada. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada es segregado extracelularmente.
- [0064] Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, por ejemplo, un polipéptido *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o un polipéptido de *Streptomyces*, por ejemplo, un polipéptido de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o un polipéptido bacteriano gram negativo, por ejemplo, un polipéptido de *E. coli* o un *Pseudomona sp.*

[0065] Un polipéptido de la presente invención puede también ser un polipéptido fúngico, y más preferiblemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*; o más preferiblemente un polipéptido filamentoso fúngico tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, o *Trichoderma*.

[0066] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis* con actividad de aumento celolítica.

[0067] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Coprinus cinereus*, *Diplodia gossypina*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Magnaporthe grisea*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pseudoplectania nigrella*, *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, o *Trichophaea saccata*.

[0068] En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Thermoascus aurantiacus*, por ejemplo, el polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2.

[0069] Se entenderá que para las especies mencionadas la invención abarca los estados imperfectos y perfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por lo que se les conoce. Expertos en la técnica fácilmente reconocen la identidad de equivalentes apropiados.

[0070] Cepas de estas especies son accesibles fácilmente al público en un número de colecciones de cultivo, tal como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0071] Además, estos polipéptidos se pueden identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., suelo, abonos, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. Técnicas para aislamiento de microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido puede luego ser obtenido de forma similar seleccionando un genómico o genoteca de ADNc de este microorganismo. Una vez una secuencia polinucleótida que codifica un polipéptido ha sido detectada con la sonda(s), el polinucleótido puede ser aislado o clonado utilizando técnicas que son bien conocidas por aquellos de habilidad común en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[0072] Polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fundidos o polipéptidos de fusión divisibles en el que otro polipéptido se funde al N-terminal o el C-terminal del polipéptido o fragmento de este. Un polipéptido fusionado se produce por fundición de una secuencia de nucleótidos (o una parte de esta) que codifica otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de esta) de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que estas están en marco y que expresión del polipéptido fusionado está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

Polinucleótidos

[0073] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados con secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de la presente invención.

[0074] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos se expone en la SEC ID n°: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos es la secuencia contenida en el plásmido pDZA2-7 que está contenido en *Escherichia coli* NRRL B-30704. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos es la región de codificación de polipéptido maduro de la SEC ID n°: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos es la región de codificación de polipéptido maduro contenida en el plásmido pDZA2-7 que está contenido en *Escherichia coli* NRRL B-30704. La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2 o el polipéptido maduro de esta, que difiere de la SEC ID n°: 1 en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de la SEC ID n°: 1 que codifican fragmentos de la SEC ID n°: 2 que tienen actividad de aumento celolítica.

[0075] La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes comprendiendo al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n°: 1 en la que la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que consiste de los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2.

[0076] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento del ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de estos. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de este ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando reacción en cadena de polimerasa (PCR) bien conocida o seleccionando anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, *PCR: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tal como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA) pueden utilizarse. Los polinucleótidos se pueden clonar de una cepa de *Thielavia*, u otra u organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región de codificación de polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0077] La presente invención también se refiere a polinucleótidos con secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad a la secuencia codificante de polipéptido maduro de la SEC ID n°: 1 (es decir, nucleótidos 67 a 805) de al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, incluso más preferiblemente al menos 90%, de forma más preferida al menos 95%, e incluso de forma más preferida al menos 97%, 98%, o 99% de identidad, que codifica un polipéptido activo.

[0078] Modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas que no ocurren de manera natural del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna manera creada genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en la actividad específica, termostabilidad, pH óptimo, o similares. La secuencia variante puede construirse basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la región de codificación del polipéptido de la SEC ID n°: 1, por ejemplo, una subsecuencia de esta, y/o por introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificadas por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, ver, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

[0079] Será aparente a los expertos en la técnica que estas sustituciones pueden hacerse fuera de las regiones más importantes a la función de la molécula y todavía suponer un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales a la actividad del polipéptido codificados por un polinucleótido aislado de la invención y por lo tanto preferiblemente no sujeto a sustitución, se puede identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta técnica, mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de aumento celulolítica para identificar residuos de aminoácidos que son muy importantes para la actividad de la molécula. Sitios de interacción sustrato-enzima pueden también ser determinados por análisis de la estructura tridimensional como determinado por tales técnicas como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado de fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-644).

[0080] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de astringencia muy bajas, preferiblemente condiciones de astringencia bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia media, más preferiblemente condiciones de astringencia medio altas, incluso más preferiblemente condiciones de astringencia altas y de forma más preferida condiciones de astringencia muy alta con (i) los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de estas (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define aquí.

[0081] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos por (a) hibridación de una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas, medias, medio altas, altas, o muy altas con (i) los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 67 a 805 de la SEC ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii); y (b) aislamiento del polinucleótido hibridante, que codifica un polipéptido con actividad de aumento celulolítica.

[0082] En un aspecto preferido, la población de ADN es hibridada bajo condiciones de astringencia bajas. En un aspecto más preferido, la población de ADN es hibridada bajo condiciones de astringencia medias. En un aspecto incluso más preferido, la población de ADN es hibridada bajo condiciones de astringencia medio altas. En un aspecto más preferido, la población de ADN es hibridada bajo condiciones de astringencia altas.

65 Construcciones de ácidos nucleicos

[0083] La presente invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos comprendiendo un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0084] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de maneras para proveer expresión del polipéptido. Manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias polinucleótidas utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0085] La secuencia de control puede ser una secuencia del promotor apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia del promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0086] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis* y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25). Además promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

[0087] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* e isomerasa de fosfato de triosa de *Aspergillus oryzae*); y promotores híbridos truncados mutantes de estos.

[0088] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488.

[0089] La secuencia de control puede también ser una secuencia de terminación de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia de terminación se une operativamente al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0090] Terminadores preferidos para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0091] Terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (CYC1) y glicer aldehído-3-fosfato dehidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0092] La secuencia de control puede también ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para traducción por la célula huésped. La secuencia líder se une operativamente al 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0093] Líderes preferidas para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0094] Líderes adecuadas para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0095] La secuencia de control puede también ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia unida operativamente al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0096] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0097] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0098] La secuencia de control puede también ser una región de codificación de péptido señal que codifica a una secuencia de aminoácidos unida al amino terminal de un polipéptido y dirige al polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede intrínsecamente contener una región de codificación de péptido señal naturalmente unida en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región de codificación de péptido señal que es extranjero a la secuencia codificante. La región de codificación de péptido señal extranjero puede requerirse donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una región de codificación de péptido señal. Alternativamente, la región de codificación del péptido señal extranjero puede simplemente reemplazar la región de codificación del péptido señal natural para mejorar secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región de codificación del péptido señal que dirige al polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección, es decir, segregado en un medio de cultivo, se puede utilizar en la presente invención.

[0099] Regiones de codificación de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las regiones de codificación de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, dubtilisina de *Nacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y *Bacillus subtilis* prsA. Además, péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

[0100] Regiones de codificación de péptido señal eficaces para células huésped filamentosas fúngicas son las regiones de codificación del péptido señal obtenido de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

[0101] En un aspecto preferido, la región de codificación de péptido señal es los nucleótidos 1 a 66 de la SEC ID n°: 1 que codifica los aminoácidos 1 a 22 de la SEC ID n°: 2.

[0102] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones de codificación de péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0103] La secuencia de control puede también ser una región de codificación de propéptido que codifica a una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir a un polipéptido maduro activo por escisión autocatalítica o catalítica del propéptido del propolipéptido. La región de codificación del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0104] Donde ambos péptido señal y regiones de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al amino terminal de la región de propéptido.

[0105] Puede también ser deseable añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que causan que la expresión del gen cambie de ON u OFF en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp.

En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 pueden ser utilizados. En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son los que permiten amplificación génica. En sistemas eucariotas, estos incluyen el gen de dihidrofolato-reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido sería unida operativamente con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0106] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes comprendiendo un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Varios ácidos nucleicos y secuencias de control descritos aquí pueden juntarse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en estos sitios. Alternativamente, una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o una construcción de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante se une operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0107] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducida. Los vectores pueden ser plásmidos circulares cerrados o lineales.

[0108] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón pueden ser utilizados.

[0109] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten selección fácil de células transformadas, modificadas, transducidas, o similares. Una etiqueta seleccionable es un gen, el producto del cual proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

[0110] Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como ampicilina, canamicina, cloranfenicol, o resistencia a la tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato), *andtrpC* (sintasa de antranilato), al igual que equivalentes de estos. Preferido para uso en una célula de *Aspergillus* son los genes *amdS* and *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus*.

[0111] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento(s) que permite integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la celular independiente del genoma.

[0112] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa en el cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10.000 pares de bases y de forma más preferida de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad con la secuencia blanco correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia blanco en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias codificantes o no codificantes de nucleótidos. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0113] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite al vector replicar de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que media replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que habilita a un plásmido o vector para replicar *in vivo*.

[0114] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 permitiendo replicación en *E. coli* y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1 permitiendo replicación en *Bacillus*.

[0115] Ejemplos de orígenes de replicación para uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0116] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula filamentosa fúngica son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163-9175; WO 00/24883). Aislamiento del gen AMA1 y construcción de plásmidos o vectores comprendiendo el gen, lo que se puede realizar según los métodos descritos en la WO 00/24883.

[0117] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en la célula huésped para aumentar producción del producto genético. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador amplificable seleccionable con el polinucleótido donde células con copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y así copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0118] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0119] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, comprendiendo un polinucleótido de la presente invención, que es ventajosamente usado en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector comprendiendo un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector ese mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped en gran parte depende del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0120] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procariota, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

[0121] Microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas incluyendo, pero no limitado a, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomices murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico.

[0122] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

[0123] La célula huésped puede también ser una eucariota, tal como una célula mamífera, de insecto, planta, o célula fúngica.

[0124] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongo", como se utiliza en este caso, incluye los fila *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como se define por Hawksworth *et al.*, En *Einsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que el *Oomycota* (como se cita en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, page 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

[0125] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye levadura ascosporógena (Endomicetales), levadura basidiosporogenous y levadura de los hongos Imperfecti (*Blastomycetes*). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9*, 1980).

[0126] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

[0127] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0128] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula micótica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. Crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0129] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0130] En un aspecto más preferido, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped filamentosa fúngica es una células de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0131] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso implicando formación de protoplasto, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular en una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformación de especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede ser transformada usando los procedimientos descritos por Becker and Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194*, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

Métodos de producción

[0132] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, comprendiendo: (a) cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la célula es del género *Thermoascus* y, más preferiblemente, *Thermoascus aurantiacus*.

[0133] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, comprendiendo: (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

[0134] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, comprendiendo: (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutante con al menos una mutación en la región de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID n°: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que consiste de los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2, y (b) recuperación del polipéptido.

[0135] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación y fermentación a gran escala o a pequeña escala (incluyendo fermentaciones

continua, por lotes, por lote alimentado, o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido expresarse y/o aislarse. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega en el medio, este se puede recuperar de lisatos celulares.

[0136] Los polipéptidos con actividad de aumento celulolítica son detectados usando los métodos descritos aquí.

[0137] El polipéptido resultante puede ser recuperado usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede ser recuperado del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

[0138] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (p. ej., intercambio de iones, afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos substancialmente puros.

Plantas

[0139] La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal que ha sido transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de aumento celulolítica de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta con el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejora de valor nutritivo, palatabilidad y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

[0140] La planta transgénica puede ser *dicotyledonous* (un dicotiledóneo) o *monocotyledonous* (un monocotiledóneo). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como césped de pradera (pasto azul, Poa), hierba forrajera tal como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0141] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tal como coliflor, semilla de colza y el modelo cercanamente relacionado con organismo *Arabidopsis thaliana*.

[0142] Ejemplos de partes de planta son vástago, callo, hojas, raíz, frutas, semillas y tubérculos al igual que los tejidos individuales comprendiendo estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos de célula vegetal específicos, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma son también considerados como una parte de planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera como una parte de planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

[0143] También incluido dentro del campo de la presente invención está la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0144] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye por incorporación de una o más construcciones de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de planta o genoma de cloroplasto y propagan la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

[0145] La construcción de expresión es convenientemente una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente unido con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de planta de elección. Además, la construcción de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para identificación de células huésped en las que la construcción de expresión ha sido integrada y secuencias de ADN necesarias para introducción de la construcción en la planta en cuestión (esta última depende del método de introducción de ADN que se usa).

[0146] La elección de secuencias reguladoras, tales como promotor y secuencias de terminación y opcionalmente secuencias señal o de tránsito son determinadas, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea el polipéptido que se exprese. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, fase o tejido específico, y el producto genético puede estar

dirigido a un tejido específico o parte de planta tal como semillas o hojas. Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0147] Para expresión constitutiva, el 35S-CaMV, la ubiquitina de maíz 1, y el promotor de actina de arroz 1 se pueden usar (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294, Christensen *et al.*, 1992, *Plant Mo. Biol.* 18: 675-689; Zhang *et al.*, 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165). Promotores específicos a un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tal como semillas, tubérculos de patata y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor de albúmina de arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de Vicia faba de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo de aceite de semilla (Chen *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor napA de la proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en la WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor de rbcS de arroz o tomate (Kyoizuka *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor de gen de metiltransferasa de adenina de virus de chlorella (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor aldP de gen de arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-67), o un promotor inducible dañado tal como el promotor pin2 de patata (Xu *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducido por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de planta tal como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico y metales pesados.

[0148] Un elemento promotor intensificador puede también ser usado para conseguir expresión mayor de un polipéptido de la presente invención en la planta. Por ejemplo, el elemento promotor intensificador puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra*, revela el uso del primer intrón del gen de actina de arroz 1 para mejorar expresión.

[0149] El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte de la construcción de expresión se puede elegir de aquellas disponibles en la técnica.

[0150] La construcción de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística y electroporación (Gasser *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

[0151] Actualmente, transferencia de gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generación de dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, ver Hooykas and Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38) y también puede usarse para transformación de monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación se usan frecuentemente usado para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generación de monocotiledóneas transgénicas es bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno revestido con la transformación ADN) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Un método alternativo para transformación de monocotiledóneas se basa en transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

[0152] Después de transformación, los transformantes que han sido incorporados a la construcción de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Con frecuencia, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de selección de genes bien durante regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos construcciones de T-ADN separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0153] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal comprendiendo un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad de aumento celulolítica de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

Composiciones

[0154] La presente invención también se refiere a composiciones comprendiendo un polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de aumento celulolítica de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0155] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente más importantes, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender además una o más actividades enzimáticas, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa,

endoglucanasa, esterasa, alfa-galactosidasa, galactosidasa beta, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidadasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasa. La enzima(s) adicional puede ser producida, por ejemplo, por un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0156] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido para ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0157] Ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención se dan debajo. La dosificación de la composición del polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa pueden ser determinadas basándose en métodos conocidos en la técnica.

Degradación o conversión de biomasa a monosacáridos, disacáridos y polisacáridos

[0158] La presente invención también se refiere a métodos para degradar o convertir un material celulósico, comprendiendo: tratamiento del material celulósico con una cantidad eficaz de una proteína celulolítica en presencia de una cantidad eficaz del polipéptido con actividad de aumento celulolítica, donde la presencia del polipéptido con actividad de aumento celulolítica aumenta la degradación o conversión de material celulósico en comparación con la ausencia del polipéptido con actividad de aumento celulolítica.

[0159] Los polipéptidos y células huésped de la presente invención se pueden utilizar en la producción de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como materias primas químicas o de fermentación a partir de biomasa para la producción de etanol, plástico, otros productos o productos intermedios. En particular, los polipéptidos y células huésped de la presente invención se pueden utilizar para aumentar el valor de residuos de tratamiento (grano de destiladores secos, granos consumidos de elaboración, bagazo de caña de azúcar, etc.) por solubilización completa o parcial de celulosa o hemicelulosa. En el impulso del tratamiento por proteínas celulolíticas de material celulósico para glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa, sus polímeros, o productos derivados de estos como se describe debajo. Los polipéptidos puede estar en forma de un caldo de fermentación crudo con o sin las células o en forma de una preparación semi-purificada o purificada enzimática. La proteína de aumento celulolítica puede ser una preparación monocomponente, por ejemplo, una proteína de la familia 61, una preparación de proteína de varios componentes, por ejemplo, varias proteínas de la familia 61 o una combinación de preparaciones de proteína monocomponente y de varios componentes. Las proteínas de aumento celulolíticas pueden impulsar la actividad de proteínas celulolíticas, bien en el intervalo de pH ácido, neutro o alcalino. Alternativamente, una célula huésped de la presente invención se puede utilizar como una fuente del polipéptido en un proceso de fermentación con la biomasa. La célula huésped puede también contener genes heterólogos o nativos que codifican proteína celulolítica al igual que otras enzimas útiles en el procesamiento de biomasa.

[0160] La biomasa puede incluir, pero no está limitado a, recursos de madera, desperdicios sólidos municipales, papel usado, cultivos y residuos de cultivo (ver, por ejemplo, Wiseloge *et al.*, 1995, in *Handbook on Bioethanol* (Charles E. Wyman, editor), pp.105- 118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, *Bioresource Technology* 50: 3-16; Lynd, 1990, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24/25: 695-719; Mosier *et al.*, 1999, *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23-40, Springer-Verlag, New York).

[0161] El polisacárido predominante en la pared celular primaria de biomasa es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa y el tercero es pectina. La pared celular secundaria, producida después de que la célula ha detenido el crecimiento, también contiene polisacáridos y se refuerza por lignina polimérica reticulada de manera covalente a hemicelulosa. Celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y así un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos y mananos en las estructuras ramificadas de complejo con un espectro de sustituyentes. Aunque generalmente celulosa polimorfa se encuentra en tejido vegetal principalmente como una matriz de cristalina insoluble de cadenas de glucano paralelas. Hemicelulosas normalmente une hidrógeno a celulosa, al igual que a otras hemicelulosas, que ayudan estabilizan a la matriz de la pared celular.

[0162] En los métodos de la presente invención, la proteína celulolítica puede ser cualquier proteína implicada en el procesamiento de material celulósico a glucosa, o hemicelulosa a xilosa, manosa, galactosa y arabinosa, sus polímeros, o productos derivados de estos como se describe abajo. La proteína celulolítica puede ser una preparación monocomponente, por ejemplo, una celulasa, una preparación de varios componentes, por ejemplo, endoglucanasa,

celobiohidrolasa, glucohidrolasa, beta-glucosidasa, tal y como se define por debajo o una combinación de preparaciones de proteína monocomponente y de varios componentes. Las proteínas celulolíticas pueden tener actividad, es decir, hidrolizar celulosa, bien en el intervalo de pH ácido, neutro, o alcalino.

5 [0163] La proteína celulolítica puede ser de origen bacteriano o fúngico, que puede ser obtenible o aislado y purificado de microorganismos que se conocen por ser capaces de producir enzimas celulolíticas, por ejemplo, especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Coprinus*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scytalidium*, *Penicillium* o *Aspergillus* (ver, por ejemplo, EP 458162), especialmente aquellas producidas por una cepa seleccionada de la especie *Humicola insolens* (reclasificada como *Scytalidium thermophilum*, ver por ejemplo, patente US n.º. 4,435,307), *Coprinus cinereus*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Meripilus giganteus*, *Thielavia* 10 *terrestris*, *Acremonium* sp., *Acremonium persicinum*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium brachypenium*, *Acremonium dichromosporum*, *Acremonium obclavatum*, *Acremonium pinkertoniae*, *Acremonium roseogriseum*, *Acremonium incoloratum* y *Acremonium furatum*; preferiblemente de la especie *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, 15 *Cephalosporium* sp. CBS 535.71, *Acremonium brachypenium* 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. Proteínas celulolíticas se pueden obtener también de *Trichoderma* (particularmente *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma koningii*), *Bacillus* 20 alcalofílicos (ver, por ejemplo, patente US n.º. 3,844,890 y EP 458162) y *Streptomyces* (ver, por ejemplo, EP 458162). Mutantes de proteína químicamente modificados o creados genéticamente se incluyen.

[0164] Proteínas celulolíticas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas. Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en EP 495,257, EP 531,372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros 25 ejemplos son variantes de celulasas tales como los descritos en WO 94/07998, EP 531,315, patente US n.º. 4,435,307, patente US n.º. 5,457,046, patente US n.º. 5,648,263, patente US n.º. 5,686,593, patente US n.º. 5,691,178, patente US n.º. 5,763,254, patente US n.º. 5,776,757, WO 89/09259, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0165] Las proteínas celulolíticas y proteínas de aumento 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 30 fuentes de nitrógeno y carbono adecuadas y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Bennett, J.W. and LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Intervalos de temperatura y otras condiciones adecuadas para 35 crecimiento y producción de proteína celulolítica se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Bailey, J.E., and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

[0166] La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula dando como resultado la expresión o aislamiento de una proteína celulolítica o proteína de aumento celulolítica. Fermentación puede, por lo tanto, ser 40 entendida como comprendiendo cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lotes, por lote alimentado, o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten a la proteína celulolítica o proteína de mejor celulolítica expresarse o aislarse.

[0167] Las proteínas resultantes celulolíticas o proteínas de aumento celulolíticas producidas por los métodos anteriormente descritos pueden ser recuperadas del medio de fermentación por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugado, filtración, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. La 45 proteína recuperada puede luego ser además purificada por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar.

50 [0168] La proteína celulolítica puede hidrolizar o 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). Determinación de actividad de celulasas, medida en cuanto a unidad de viscosidad de celulasas (CEVU), cuantifica la cantidad de actividad catalítica presente en prueba A por medición de la 55 capacidad de la muestra para reducir la viscosidad de una solución de carboximetilcelulosa (CMC). El ensayo se realiza a la temperatura y el pH adecuados para la proteína celulolítica y sustrato. Para Celluclast™ (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) el ensayo se realiza a 40°C en 0,1 M de tampón fosfato pH 9,0 durante 30 minutos con CMC como sustrato (33,3 g/L de 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 60 CELLUZYME™ estándar 17-1194 (obtenido de Novozymes A/S).

[0169] Ejemplos de preparaciones celulolíticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLUCLAST™ (disponible de Novozymes A/S) y NOVOZYM™ 188 (disponible de Novozymes A/S). Otras 65 preparaciones disponibles comercialmente que comprenden celulasas que se puede usar incluyen CELLUZYME™, CEREFLO™ y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAMINEX™ y SPEZYME™ CP (Genencor Int.) y ROHAMENT™ a 7069 W (Röhm GmbH). Las enzimas de celulasas se agregan en cantidades efectivas 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 forma más preferida de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 2,0% en peso de sólidos.

[0170] Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas celulolíticas o proteínas de aumento celulolíticas usadas en los métodos de la presente invención pueden ser preparaciones monocomponente, es decir, un componente esencialmente libre de otros componentes celulolíticos. 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 transformadas con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (ver, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244). Otros ejemplos de proteínas celulolíticas de monocomponente incluyen, pero de forma no limitativa, aquellas descritos en JP-07203960-A y WO-9206209. El huésped es preferiblemente un huésped heterólogo (la enzima es extranjera al huésped), pero el huésped puede bajo condiciones determinadas también ser un huésped homólogo (la enzima es nativa al huésped). Proteínas monocomponente celulolíticas puede también ser preparadas por purificación de tal proteína de un caldo de fermentación.

[0171] Ejemplos de proteínas celulolíticas de monocomponente útiles en la práctica de los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, endoglucanasa, celobiohidrolasa, glucohidrolasa y beta-glucosidasa.

[0172] El término "endoglucanasa" se define aquí como una endo-1,4-(1,3,1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. N°. 3.2.1.4), que cataliza endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados de celulosa (tales como carboximetilcelulosa y hidroxietil celulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en mezcla con beta-1,3 glucanos tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal con componentes celulósicos. Para fines de la presente invención, la actividad de endoglucanasa es determinada usando la hidrólisis de carboximetil celulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268.

[0173] Las exo-1,4-beta-D-glucanasas incluyen ambas celobiohidrolasas y glucohidrolasas.

[0174] El término "celobiohidrolasa" se define aquí como un 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier beta-1,4-glucosa unida con polímero, liberando celobiosa de los extremos reductores o no reductores de la cadena. Para fines de la presente invención, actividad de 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 and Claeysens, 1985, *FEBS Letters* 187: 283-288. En la presente invención, el método de Lever *et al.* fue empleado para valorar hidrólisis de celulosa en los restos de maíz, mientras el método de van Tilbeurgh *et al.* fue usado para determinar la actividad de celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente.

[0175] El término "glucohidrolasa" se define aquí como una 1,4-beta-D-glucano glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.74), que cataliza la hidrólisis de 1,4-enlaces (enlaces O-glicosil) en 1,4-beta-D-glucanos para eliminar unidades de glucosa sucesivas. Para fines de la presente invención, actividad de exoglucanasa se determina según el procedimiento descrito por Himmel *et al.*, 1986, *J. Biol. Chem.* 261: 12948-12955.

[0176] El término "beta-glucosidasa" se define aquí como una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa terminal no-reductores con la liberación de beta-D-glucosa. Para fines de la presente invención, actividad de beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi *et al.*, 2002, *J. Basic Microbiol.* 42: 55-66, excepto que condiciones diferentes fueron empleadas como se describe en este caso. Una unidad de actividad de beta-glucosidasa es definida como 1,0 μ mol de p-nitrofenol producido por minuto a 50°C, pH 5 de 4 mM de P-nitrofenil-beta-d-glucopiranosido como sustrato en 100 mM de citrato sódico, 0,01% de Tween-20.

[0177] Los polipéptidos de la presente invención se usan conjuntamente con proteínas celulolíticas para degradar el componente celulósico del sustrato de biomasa, (ver, por ejemplo, Brigham *et al.*, 1995, en *Handbook on Bioethanol* (Charles E. Wyman, editor), pp.119-141, Taylor & Francis, Washington D.C. ; Lee, 1997, *Journal of Biotechnology* 56: 1-24).

[0178] Las cantidades óptimas de un polipéptido con actividad de aumento celulolítica y de proteínas celulolíticas depende de los diferentes factores incluyendo, pero no limitado a, la mezcla de componentes de proteínas celulolíticas, el sustrato celulósico, la concentración de sustrato celulósico, el pretratamiento(s) del sustrato celulósico, temperatura, tiempo, pH, e inclusión de organismo de fermentación (p. ej., levadura para sacarificación y fermentación simultáneas). El término "proteínas celulolíticas" se define aquí como aquellas proteínas o mezclas de proteínas que muestran ser capaces de hidrolización o conversión o degradación de celulosa bajo las condiciones evaluadas. Sus cantidades son normalmente medidas por un ensayo común tal como BCA (ácido bicinonínico, P.K. Smith *et al.*, 1985, *Anal. Biochem.* 150: 76), y la cantidad preferida añadida en proporción a la cantidad de biomasa que se hidroliza.

[0179] En un aspecto preferido, la cantidad de polipéptido con actividad de aumento celulolítica por g de material celulósico es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,0 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 1,5 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,25 mg, más

preferiblemente de aproximadamente 0,075 a aproximadamente 1,25 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,25 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,25 mg, y de la forma más preferible aproximadamente 0,15 a aproximadamente 1,0 mg por g de material celulósico.

[0180] En otro aspecto preferido, la cantidad de proteínas celulolíticas por g de material celulósico es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 20 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,75 a aproximadamente 15 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg, y de forma más preferida de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 10 mg por g de material celulósico.

[0181] En un aspecto preferido, la cantidad de polipéptido con actividad de aumento celulolítica por g de proteínas celulolíticas es de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 g, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,5 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 g, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 g, y de forma más preferida de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 g por g de proteínas celulolíticas.

[0182] Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para procesar un material celulósico para muchos productos orgánicos, productos químicos y combustibles útiles. Además de etanol, algunos productos químicos de consumo diario y de especialidad que se pueden producir a partir de celulosa incluyen xilosa, acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgánicos (p. ej., ácido láctico), 1,3-propanediol, butanodiol, glicerol, etilenglicol, furfural, polihidroxialcanoatos, cis, ácido cis-mucónico, y pienso para animales (Lynd, L. R., Wyman, C. E., and Gerngross, T. U., 1999, *Biocommodity 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., and Mandels, M., 1980, *Cellulases: biosynthesis and applications*, *Enz. Microb. Technol.*, 2: 91-102). Beneficios de coproducción potenciales se extienden más allá de la síntesis de productos múltiples orgánicos de carbohidrato fermentable. Residuos ricos en lignina restantes después de tratamiento biológico pueden convertirse a productos químicos derivados de lignina, o usados para producción de energía.

[0183] Métodos convencionales usados para procesar el material celulósico 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 operar conforme a la invención.

[0184] Tal aparato puede incluir un reactor agitado por lotes, un reactor agitado de flujo continuo con ultrafiltración, un reactor de columna de flujo de tapón continua (Gusakov, A. V., and Sinitsyn, 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., and Lee, J. M., 1983, *Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor*, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65), o un reactor con agitación intensiva inducido por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinitsyn, 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).

[0185] Los métodos convencionales incluyen, pero de forma no limitativa, sacarificación, fermentación, hidrólisis fermentación separadas (SHF), sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), sacarificación y cofermentación simultáneas (SSCF), hidrólisis híbrida y fermentación (HHF) y conversión directa microbiana (DMC).

[0186] SHF usa pasos de proceso separados para primero hidrolizar enzimáticamente celulosa a glucosa y luego fermentar glucosa a etanol. En SSF, la hidrólisis enzimática de celulosa y la fermentación de 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 que la cepa de fermentación puede tolerar. DMC combina todos los tres procesos (producción de celulosa, hidrólisis de celulosa y fermentación) en un paso (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S., 2002, *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*, *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 66: 506-577).

[0187] "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refieren a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso comprendiendo un paso de fermentación. Un proceso de fermentación incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir productos de fermentación incluyendo alcoholes (p. ej., arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanediol, sorbitol, y xilitol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-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 (H₂), dióxido de carbono (CO₂) y monóxido de carbono (CO)). Procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación usados en la industria del alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino), industria de lechería (p. ej., productos lácteos fermentados), industria de cuero e industria del tabaco.

[0188] La presente invención además se refiere a métodos para producir una sustancia orgánica, comprendiendo: (a) sacarificación de un material celulósico con una cantidad eficaz de una proteína celulolítica en presencia de una cantidad eficaz de un polipéptido con actividad de aumento celulolítica, donde la presencia del polipéptido con actividad de aumento celulolítica aumenta la degradación de material celulósico en comparación con la ausencia del polipéptido con actividad de aumento celulolítica; (b) fermentación del material sacarificado celulósico del paso (a) con uno o más microorganismos fermentadores; y (c) recuperación de la sustancia orgánica de la fermentación. El polipéptido con actividad de aumento celulolítica puede estar en forma de un caldo de fermentación crudo con o sin células o en forma de una preparación enzimática semi-purificada o purificada. La proteína de aumento celulolítica puede ser una preparación monocomponente, por ejemplo, una proteína de la familia 61, una preparación de proteína de varios componentes, por ejemplo, varias proteínas de la familia 61, o una combinación de preparaciones de proteína monocomponente y de varios componentes.

[0189] La sustancia orgánica puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. En un aspecto preferido, la sustancia orgánica es un alcohol. Se entenderá que el término "alcohol" abarca una sustancia orgánica que contiene una o más fracciones de hidróxilo. En un aspecto más preferido, el alcohol es arabinitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es butanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es etanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es glicerol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es metanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es 1,3-propanediol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es sorbitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es xilitol. Ver, por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and 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.; and 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.

[0190] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es un ácido orgánico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acético. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acetónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido adipico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido ascórbico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido cítrico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido 2,5-diceto-D-glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fórmico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fumárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucurónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glutárico. En otro aspecto preferido, el ácido orgánico es ácido3-hidroxipropiónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido itacónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido láctico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido málico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido malónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido oxálico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido propiónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido succínico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido xilónico. Ver, por ejemplo, Chen, R., and Lee, Y. Y., 1997, *Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448.

[0191] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es una cetona. Se entenderá que el término "cetona" abarca una sustancia orgánica que contiene una o más fracciones de cetona. En otro aspecto más preferido, la cetona es acetona. Ver, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, *supra*.

[0192] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es un aminoácido. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido aspártico. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es ácido glutámico. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es glicina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es lisina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es serina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es treonina. Ver, por ejemplo, Richard, A., and 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.

[0193] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es un gas. En otro aspecto más preferido, el gas es metano. En otro aspecto más preferido, el gas es H₂. En otro aspecto más preferido, el gas es CO₂. En otro aspecto más preferido, el gas es CO. Ver, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya, and K. Kiriya, 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. in *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, *Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review*.

[0194] Producción de una sustancia orgánica de material celulósico típicamente requiere cuatro pasos importantes. Estos cuatro pasos son pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación. Ejemplificado debajo está un proceso para producir etanol, pero se entenderá que procesos similares pueden utilizarse para producir otras sustancias orgánicas, por ejemplo, las sustancias anteriormente descritas.

[0195] Pretratamiento. En el paso de pretratamiento o de pre-hidrólisis, el material celulósico se calienta para descomponer la lignina y la estructura de carbohidrato, solubilizar la mayor parte de la hemicelulosa y hacer la fracción de celulosa accesible a enzimas celulolíticas. La calefacción es realizada bien directamente con vapor o en el compuesto acuoso donde un catalizador puede también ser añadido al material para acelerar las reacciones. Catalizadores incluyen ácidos fuertes, tales como ácido sulfúrico y SO₂, o álcali, tal como hidróxido sódico. El propósito de la fase de pretratamiento es facilitar la penetración de las enzimas y microorganismos. Biomasa celulósica puede también ser sujeto para un pretratamiento de explosión de vapor hidrotérmico (ver solicitud de patente US n°. 20020164730).

[0196] Sacarificación. En el paso de hidrólisis enzimática, también conocido como sacarificación, enzimas como se describe en este caso se agregan al material pretratado para convertir la fracción de celulosa a glucosa y/o otros azúcares. La sacarificación es generalmente realizada en los reactores de tanque agitado o fermentadores bajo condiciones de pH, temperatura y mezcla controladas. Un paso de sacarificación puede durar hasta 200 horas. La sacarificación se puede llevar a cabo a temperaturas de aproximadamente 30°C a aproximadamente 65°C, en particular, alrededor de 50°C, y a un pH en el intervalo entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5, especialmente alrededor de pH 4,5. Para producir glucosa que se puede metabolizar por levadura, la hidrólisis es típicamente realizada en presencia de una beta-glucosidasa.

[0197] Fermentación. En el paso de fermentación, azúcares, liberados del material celulósico como resultado del pretratamiento y pasos de hidrólisis enzimática, se fermentan a etanol por un organismo de fermentación, tal como levadura. La fermentación puede también efectuarse simultáneamente con la hidrólisis enzimática en el mismo recipiente, nuevamente bajo condiciones de pH, temperatura y mezcla controladas. Cuando la sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente en el mismo recipiente, el proceso es generalmente denominado sacarificación y fermentación simultáneas o SSF.

[0198] Cualquier sustrato celulósico o materia prima adecuados se puede utilizar en un proceso de fermentación de la presente invención. El sustrato es generalmente seleccionado basado en el producto de fermentación deseado, es decir, la sustancia orgánica para ser obtenida de la fermentación, y el proceso empleado, como es bien conocido en la técnica. Ejemplos de sustratos adecuados para uso en los métodos de presente invención, incluyen materiales con celulosa, tal como madera o residuos de planta o azúcares de peso molecular bajo DP1-3 obtenidos de material celulósico procesado que se puede metabolizar por el microorganismo fermentador y que se puede suministrar por adición directa al medio de fermentación.

[0199] El término "medio de fermentación" se entenderá para referirse a un medio antes de que el microorganismo(s) fermentador(es) es(son) añadido, tal como, un medio que resulta de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en una proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

[0200] "Microorganismo fermentador" se refiere a cualquier microorganismo adecuado para uso en un proceso de fermentación deseado. Microorganismos fermentadores 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 fermentadores incluyen organismos fúngicos, tal como levadura. Levadura preferida incluye cepas de la *Saccharomyces spp.* y, en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. Levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, Red Star®/™/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, EEUU) FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EEUU), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRANDS (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

[0201] En un aspecto preferido, la levadura es una *Saccharomyces spp.* En un aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces distaticus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces uvarum*. En otro aspecto preferido, la levadura es un *Kluyveromyces*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida pseudotropicalis*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida brassicae*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Clavispora*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora lusitaniae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora opuntiae*. En otro aspecto preferido, la levadura es un *Pachysolen*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Pachysolen tannophilus*. En otro aspecto preferido, la levadura es un *Bretanomyces*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Bretanomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, *Cellulose bioconversion technology*, en *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

[0202] Bacterias que pueden fermentar eficazmente glucosa a etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, *supra*).

[0203] Es bien conocido en la técnica que los organismos descritos anteriormente también pueden usarse para producir otras sustancias orgánicas, como se describe en este caso.

[0204] La clonación de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* (*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., and Picataggio, S., 1995, *Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic Zymomonas mobilis*, *Science* 267: 240-243; Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., and Picataggio, S., 1996, *Development of an arabinose-fermenting Zymomonas mobilis strain by metabolic pathway engineering*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4465-4470) han llevado a la construcción de organismos capaces de convertir hexosas y pentosas a etanol (cofermentación).

[0205] Levadura u otro microorganismo típicamente se añade a la celulosa degradada o hidrolizada y la fermentación está en curso durante de aproximadamente 24 a aproximadamente 96 horas, tal como de aproximadamente 35 a aproximadamente 60 horas. La temperatura está típicamente entre de aproximadamente 26°C a aproximadamente 40°C, en particular, a aproximadamente 32°C, y de sobre pH 3 a sobre pH 6, en particular, alrededor de pH 4-5.

[0206] En un aspecto preferido, levadura u otro microorganismo se aplica a la celulosa degradada o hidrolizada y la fermentación está en curso durante de aproximadamente 24 a aproximadamente 96 horas, tal como típicamente 35-60 horas. En unos aspectos preferidos, la temperatura está generalmente entre de aproximadamente 26 a aproximadamente 40°C, en particular, aproximadamente 32°C y el pH está generalmente de sobre pH 3 a sobre pH 6, preferiblemente alrededor de pH 4-5. Levadura u otro microorganismo se aplica preferiblemente en cantidades de aproximadamente 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de aproximadamente 10^7 a 10^{10} , especialmente aproximadamente 5×10^7 a recuento viable por ml de caldo de fermentación. Durante una fase de producción de etanol, el recuento de células de levadura debería preferiblemente estar en el intervalo de aproximadamente 10^7 a 10^{10} , especialmente alrededor de aproximadamente 2×10^8 . Otras orientaciones respecto al uso de levadura para fermentación se pueden encontrar en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999), que es por la presente incorporado como referencia.

[0207] El proceso usado más ampliamente en la técnica es la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) proceso donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que levadura y enzima se agregan juntas.

[0208] Para producción de etanol, después de la fermentación, la masa se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido según el proceso de la invención puede ser utilizado como, por ejemplo, etanol de combustible; etanol potable, es decir, licores potables neutros, o etanol industrial.

[0209] Un estimulador de fermentación se puede utilizar en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos aquí para mejorar además el proceso de fermentación y, en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como, mejorar la velocidad y rendimiento del etanol. Un "estimulador de fermentación" se refiere a estimuladores para crecimiento de los microorganismos fermentadores, en particular, levadura. Estimuladores de fermentación preferidos para 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. Ver, 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), que se incorpora por la presente como referencia. Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes comprendiendo P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn y Cu.

[0210] Recuperación. El alcohol es separado del material celulósico fermentado y purificado por métodos convencionales de destilación. Etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 % vol. de etanol puede obtenerse, que se puede usar como, por ejemplo, etanol de combustible, etanol potable, es decir, licores potables neutros, o etanol industrial.

[0211] Para otras sustancias orgánicas, cualquier método conocido en la técnica se puede usar incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (p. ej., intercambio de iones, afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, destilación, o extracción.

[0212] En los métodos de la presente invención, las proteína(s) celulolíticas y polipéptido(s) de aumento celulolítico se puede complementar por una o más actividades enzimáticas adicionales para mejorar la degradación del material celulósico. Enzimas preferidas adicionales son hemicelulasas, esterases (p. ej., lipasas, fosfolipasas y/o cutinasas), proteasas, lacasas, peroxidasas, o mezclas derivadas.

[0213] En los métodos de la presente invención, la enzima(s) adicional puede ser añadida antes o durante fermentación, incluso durante o después de la propagación del microorganismo(s) fermentador.

[0214] Las enzimas referenciadas aquí pueden ser derivadas u obtenidas de cualquier origen adecuado, incluyendo origen bacteriano fúngico, de levadura o mamífero. El término "obtenido" significa aquí que la enzima puede haber sido aislada de un organismo que produce naturalmente la enzima como una enzima nativa. El término "obtenido" significa también aquí que la enzima puede haber sido producida de manera recombinante en un organismo huésped, donde la enzima producida de manera recombinante es bien nativa o extranjera al organismo huésped o tiene una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, teniendo uno o más aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida de manera recombinante 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. Abarcado en el significado de una enzima nativa son variantes naturales y en el significado de una enzima extranjera son variantes obtenidas de manera recombinante, tal como por mutagénesis dirigida o redistribución.

[0215] Las enzimas pueden también ser purificadas. El término "purificado" como se utiliza en este caso cubre enzimas libres de otros componentes del organismo del que se deriva. El término "purificado" también cubre enzimas libres de componentes del organismo nativo del que es obtenida. Las enzimas puede ser purificadas, con cantidades solo menores de otra proteína que están presentes. La expresión "otras proteínas" se refiere en particular a otras enzimas. El término "purificado" como se utiliza en este caso también se refiere a 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", que es, libre de otros componentes del organismo en el que es producida, que es, por ejemplo, un organismo huésped para enzimas producidas de manera recombinante. En un aspecto preferido, 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 forma más preferida al menos 99% puras. En otro aspecto preferido, la enzima es 100% pura.

[0216] Las enzimas usadas en la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para uso en los procesos descritos aquí, tal como, por ejemplo, un caldo de fermentación crudo con o sin células, un polvo seco o granulado, un granulado no polvoriento, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Granulados pueden ser producidos, por ejemplo, como se describen en las patentes US n.º. 4,106,991 y 4,661,452, y pueden ser revestidos opcionalmente por procesos conocidos en la técnica. 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 proceso establecido. Enzimas protegidas se pueden preparar según el proceso descrito en la EP 238,216.

Hemicelulasas

[0217] Hidrólisis enzimática de hemicelulosas se puede realizar por una amplia variedad de hongos y bacterias. Similar a la degradación de celulosa, hidrólisis de hemicelulosa requiere acción coordinada de muchas enzimas. Hemicelulasas se pueden colocar en tres categorías generales: las enzimas de acción endo que atacan enlaces internos en la cadena polisacárida, las enzimas de acción exo que actúan progresivamente de bien el extremo reductor o no reductor de la cadena polisacárida, y las enzimas accesorio, acetilsterasas y esterases que hidrolizan enlaces de lignina glucósido, tales como esterasa de ácido cumárico y esterasa de ácido ferúlico (Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N., 1988, *Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications*, *Microbiol. Rev.* 52: 305-317; Tenkanen, M., and Poutanen, K., 1992, *Significance of esterases in the degradation of xylans*, in *Xylans and Xylanases*, Visser, J., Beldman, G., Kuster-van Someren, M. A., and Voragen, A. G. J., eds., Elsevier, New York, NY, 203-212; Coughlan, M. P., and Hazlewood, G. P., 1993, *Hemicellulose and hemicellulases*, Portland, London, UK; Brigham, J. S., Adney, W. S., and 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).

[0218] Hemicelulasas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, acetil xilano esterasa, glucuronidasas, endo-galactanasa, mananasas, endo o endo arabinasas, endo-galactanses y sus mezclas derivadas. Ejemplos de hemicelulasas de acción endo y enzimas auxiliares incluyen endoarabinanasa, endoarabinogalactanasa, endoglucanasa, endomananasa, endoxilanasas y feraxan endoxilanasas. Ejemplos de hemicelulasas de acción endo y enzimas auxiliares incluyen α -L-arabinosidasa, β -L-arabinosidasa, α -1,2-L-fucosidasa, α -D-galactosidasa, β -D-galactosidasa, β -D-glucosidasa, β -D-glucuronidasa, β -D-manosidasa, β -D-xilosidasa, exoglucosidasa, exocelobiohidrolasa, exomanobiohidrolasa, exomananasa, exoxilanasas, xilano α -glucuronidasa y coniferin β -glucosidasa. Ejemplos de esterases incluyen acetil esterases (acetilgalactano esterasa, acetilmanano esterasa y acetilxilano esterasa) y aril esterases (esterasa de ácido cumárico y esterasa de ácido ferúlico).

[0219] Preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa de acción exo y, más preferiblemente, una hemicelulasa de acción exo que tiene la capacidad para hidrolizar hemicelulosa bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7. Un ejemplo de una hemicelulasa adecuada para uso en la presente invención incluye VISCOZYME™ (disponible de Novozymes A/S). 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 forma más preferida de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 2,0% en peso de sólidos.

[0220] Una xilanasa (E.C. 3.2.1.8) se puede obtener de cualquier fuente adecuada, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, tales como *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Thermomyces* y *Bacillus*. Preparaciones preferidas disponibles comercialmente comprendiendo xilanasa incluyen SHEARZYME®, BIOFEED WHEAT®, BIO-, FEED Plus® L, CELLUCLAST®, ULTRAFLO®, VISCOZYME®, PENTOPAN MONO® BG, y PULPZYME® HC (Novozymes A/S) y LAMINEX® and SPEZYME® CP (Genencor Int.).

Esterasas

[0221] Esterasas que se pueden usar para bioconversión de celulosa incluyen acetil esterazas tales como acetilgalactano esterasa, acetilmanano esterasa y acetilxilano esterasa, y esterazas que hidrolizan enlaces de lignina glucósido, tales como esterasa de ácido cumárico y esterasa de ácido ferúlico.

[0222] Como se utiliza en este caso, un "esterasa" conocida también como éster hidrolasa carboxílica, se refiere a enzimas que actúan en enlaces estéricos e incluye enzimas clasificadas en EC 3.1.1 éster hidrolasas carboxílicas según nomenclatura enzimática (*Enzyme Nomenclature*, 1992, Academic Press, San Diego, California, with Supplement 1 (1993), Supplement 2 (1994), Supplement 3 (1995), Supplement 4 (1997) and Supplement 5, in *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, and *Eur. J. Biochem.* 264: 610-650, 1999; respectivamente). Ejemplos no limitativos de esterazas incluyen arilesterasa, triacilglicerol-lipasa, acetilesterasa, acetilcolinesterasa, colinesterasa, tropinesterasa, pectinesterasa, esteroide-esterasa, clorofilasa, L-arabinonolactonasa, gluconolactonasa, uronolactonasa, tanasa, 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 deacetilasa, lipoproteína-lipasa, dihidrocoumarina lipasa, limonina-D-anillo-lactonasa, esteroide-lactonasa, triacetato-lactonasa, actinomicina lactonasa, orsellinato-depsido hidrolasa, cefalosporina-C deacetilasa, clorogenato hidrolasa, alfa-aminoácido esterasa, 4-metiloxaloacetato esterasa, carboximetilenebutenolidasa, deoxilimonato A-anillo-lactonasa, 2-acetil-1-alquilglicerofosfocolina esterasa, fusarinina-C ornitineresterasa, sinapina esterasa, cera-éster hidrolasa, forbol-diéster hidrolasa, fosfatidilinositol deacilasa, sialato O-acetilesterasa, acetoxibutirilbitiofeno deacetilasa, acetilsalicilato deacetilasa, metilumbeliferil-acetato deacetilasa, 2-pirona 4,6-dicarboxilato lactonasa, N-acetilgalactosaminoglicano deacetilasa, esterasa de hormona juvenil, bis(2-etilhexil) esterasa de ftalato, glutamato metilesterasa de proteína, 11- hidrolasa de cis-retinilo-palmitato, hidrolasa de todos-trans-retinilo-palmitato, L-ramnono-1,4-lactonasa, 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno deacetilasa, etil-éster-sintasa de ácido graso, xilono-1,4-lactonasa, N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol deacetilasa, cetraxato bencilsterasa, acetilalquilglicerol acetilhidrolasa y acetilxilano esterasa.

[0223] Esterasas preferidas para 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, incluyendo lisofosfolipasas clasificadas como EC 3.1.1.5). Otras esterazas preferidas son cutinasas (clasificadas como EC 3.1.1.74).

[0224] La esterasa se puede añadir en una cantidad eficaz para obtener el beneficio deseado para mejorar el rendimiento del microorganismo fermentador, por ejemplo, para cambiar la composición/concentración lipídica interior y/o exterior del microorganismo fermentador o en la membrana celular del microorganismo fermentador, para suponer una mejora en el movimiento de solutos en y/o fuera de los microorganismos fermentadores durante fermentación y/o para proporcionar fuentes de energía más metabolizables (tales como, por ejemplo, conversión de componentes, tales como aceite del sustrato de maíz, a componentes útiles, el microorganismo fermentador, por ejemplo, ácidos insaturados grasos y glicerol), para aumentar rendimiento de etanol. Ejemplos de cantidades eficaces de esterasa son de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 400 LU/g DS (sólidos secos). Preferiblemente, la esterasa se usa en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 LU/g DS, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 LU/g DS, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 LU/g DS. Además, optimización de la cantidad de esterasa puede de aquí en adelante ser obtenida usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

[0225] Una unidad lipásica (LU) es la cantidad de enzima que libera 1,0 μmol de ácido graso valorable por minuto con tributirino como sustrato y goma arábica como emulsionante a 30°C, pH 7,0 (tampón fosfato).

[0226] En un aspecto preferido, la esterasa es una enzima lipolítica, más preferiblemente, una lipasa. Como se utiliza en este caso, una "enzima lipolítica" se refiere a lipasas y fosfolipasas (incluyendo lisofosfolipasas). La enzima lipolítica es preferiblemente de origen microbiano, en particular de origen bacteriano, fúngico o de levadura. La enzima lipolítica usada puede derivar de cualquier fuente, incluyendo, por ejemplo, una cepa de *Absidia*, en particular, *Absidia blakesleena* y *Absidia corymbifera*, una cepa de *Achromobacter*, en particular, *Achromobacter iofagus*, una cepa de

- 5 *Aeromonas*, una cepa de *Alternaria*, en particular, *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Aspergillus*, en particular, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, una cepa de *Achromobacter*, en particular, *Achromobacter iofagus*, 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*, una cepa de *Brochothrix*, en particular, *Brochothrix thermosohata*, una cepa de *Candida*, en particular, *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*), *Candida paraliopolytica* y *Candida antarctica*, una cepa de *Chromobacter*, en particular, *Chromobacter viscosum*, una cepa de *Coprinus*, en particular, *Coprinus cinereus*, 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 *Hifozima*, 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 *Rhizooctonia*, en particular, *Rhizooctonia 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*.
- 25 [0227] En un aspecto preferido, la enzima lipolítica deriva de una cepa de *Aspergillus*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Chromobacter*, *Fusarium*, *Humicola*, *Hyphozyma*, *Pseudomonas*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, o *Thermomyces*.
- 30 [0228] En aspectos más preferidos, la enzima lipolítica es una lipasa. Las lipasas se pueden aplicar aquí por su capacidad para modificar la estructura y composición de aceites de triglicéridos y grasas en los medios de fermentación (incluyendo levadura de fermentación), por ejemplo, se producen de un sustrato de maíz. Las lipasas catalizan diferentes tipos de conversiones de triglicéridos, tales como hidrólisis, esterificación y transesterificación. Lipasas adecuadas incluyen lipasas ácidas, neutras y básicas, como son bien conocidas en la técnica, aunque lipasas ácidas (tales como, por ejemplo, la lipasa G AMANO 50, disponible de Amano) parecen ser más eficaces a concentraciones inferiores de lipasa en comparación con bien lipasas básicas o neutras. Lipasas preferidas para uso en la presente invención incluyen lipasa de *Candida antarctica* y lipasa de *Candida cylindracea*. 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*.
- 40 [0229] La lipasa puede ser la describa en la EP 258,068-A o puede ser una variante de lipasa tal como una variante descrita en la WO 00/60063 o WO 00/32758, por la presente incorporadas como referencia. Lipasas comerciales preferidas incluyen LECITASE™, LIPOLASE™ y LIPEX™ (disponibles de Novozymes A/S) y G AMANO™ 50 (disponible de Amano).
- 45 [0230] Las lipasas se añaden preferiblemente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 400 LU/g DS, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 LU/g DS y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 LU/g DS.
- 50 [0231] En otro aspecto preferido de la presente invención, la esterasa es una cutinasa. La cutinasas son enzimas que son capaces de degradar cutina. La cutinasa puede derivar de cualquier fuente. En un aspecto preferido, la cutinasa 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 *Rhizooctonia*, en particular, *Rhizooctonia solani*, una cepa de *Streptomyces*, en particular, *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular, *Ulocladium consortiale*. En un aspecto más preferido la cutinasa deriva de una cepa de *Humicola insolens*, en particular, la cepa de *Humicola insolens* DSM 1800. Cutinasa de *Humicola insolens* se describe en la WO 96/13580, que es por la presente incorporada como referencia. La cutinasa puede ser un variante tal como una de las variantes descritas en las WO 00/34450 y WO 01/92502, que son por la presente incorporadas como referencia. Variantes de cutinasa preferidas incluyen variantes catalogadas en el ejemplo 2 de la WO 01/92502 que es por la presente específicamente incorporada como referencia. 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. Optimización adicional de la cantidad de cutinasa puede de aquí en adelante ser obtenida usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.
- 65

[0232] En otro aspecto preferido, la esterasa es una fosfolipasa. Como se utiliza en este caso, el término "fosfolipasa" es una enzima que tiene actividad hacia fosfolípidos, por ejemplo, actividad hidrolítica. Fosfolípidos, tales como lecitina o fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en una posición externa (sn-1) y una en medio (sn-2) y esterificado con ácido fosfórico en la tercera posición. El ácido fosfórico se puede esterificar a un aminoalcohol.

Diferentes tipos de actividad fosfolipásica se pueden distinguir, incluyendo fosfolipasas A1 y A2 que hidrolizan un grupo acilo graso (en las posiciones sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que hidroliza el grupo ácido graso restante en el lisofosfolípido. Fosfolipasa C y fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacil glicerol o ácido fosfatídico respectivamente.

[0233] El término "fosfolipasa" incluye enzimas con actividad fosfolipásica, por ejemplo, fosfolipasa A (A1 o A2), actividad de fosfolipásica B, actividad de fosfolipasa C, o actividad de fosfolipasa D. El término "fosfolipasa A" como se utiliza en este caso se destina a cubrir una enzima con actividad de fosfolipasa A1 y/o de fosfolipasa A2. La actividad fosfolipásica se puede proporcionar por enzimas con 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 otros aspectos, la actividad enzimática de fosfolipasa está provista por una enzima con esencialmente solo actividad fosfolipásica y donde la actividad enzimática de fosfolipasa no es una actividad secundaria.

[0234] La fosfolipasa puede ser de cualquier origen, por ejemplo, de origen animal (p. ej., mamífero, por ejemplo, páncreas bovino o porcino), o veneno de serpiente o veneno de abeja. Alternativamente, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo, de hongos filamentosos, levadura o bacterias, tales 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. arrizus*, *R. japonicus*, o *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*.

[0235] Fosfolipasas preferidas comerciales incluyen LECITASE™ y LECITASE™ ULTRA (disponibles de Novozymes A/S).

[0236] 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. Optimización adicional de la cantidad de fosfolipasa puede de aquí en adelante ser obtenida usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Proteasas

[0237] En otro aspecto preferido de la invención, al menos un surfactante 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 nitrógeno libre de amino (FAN). Esta función de aminoácidos libres como nutrientes para la levadura, mejora así el crecimiento de la levadura y, consecuentemente, la producción de etanol.

[0238] El microorganismo fermentador para uso en un proceso de fermentación se puede producir mediante la propagación del microorganismo fermentador en presencia de al menos una proteasa. Aunque sin limitarse a ninguna teoría de operación, se cree que la propagación del microorganismo fermentador con una cantidad eficaz de al menos una proteasa reduce el tiempo de retraso del microorganismo fermentador cuando el microorganismo fermentador se usa posteriormente en un proceso de fermentación en comparación con un microorganismo fermentador que fue propagado bajo las mismas condiciones sin la adición de la proteasa. La acción de la proteasa en el proceso de propagación se cree que directa o indirectamente supone la supresión o expresión de genes que son perjudiciales o provechosos, respectivamente, al microorganismo fermentador durante fermentación, así disminuye el tiempo de retardo y da como resultado un ciclo de fermentación más rápido.

[0239] Proteasas se conocen bien en la técnica y se refieren a enzimas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos. Proteasas adecuadas incluyen proteasas fúngicas y bacterianas. Proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7. Proteasas fúngicas ácidas adecuadas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpeix*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Se contemplan especialmente proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (ver, por ejemplo, Koaze et al., 1964, *Agr. Biol. Chem. Japan* 28: 216), *Aspergillus saitoi* (ver, 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*.

[0240] Proteasas bacterianas, que no son proteasas ácidas, incluyen los productos disponibles comercialmente ALCALASE™ y NEUTRASE™ a (disponibles de Novozymes A/S). Otras proteasas incluyen GC106 de Genencor internacional, Inc., EEUU y NOVOZYM™ 50006 de Novozymes A/S.

[0241] Preferiblemente, la proteasa es una proteasa de ácido aspártico, como se describe, por ejemplo, en *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Chapter 270. Ejemplos adecuados de proteasas de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellos descritos por Berka et al., 1990, Gene 96: 313; Berka et al., 1993, Gene 125: 195-198 ; and Gomi et al., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

Peroxidasas

[0242] Otros compuestos que poseen actividad de peroxidasa pueden ser cualquier peroxidasa (EC 1.11.1.7), o cualquier fragmento con actividad de peroxidasa derivado de esta, que muestra actividad de peroxidasa.

[0243] Preferiblemente, la peroxidasa se produce por plantas (p. ej., peroxidasa de alfalfa o de semilla de soja) o microorganismos tales como hongos o bacterias.

[0244] Algunos hongos preferidos incluyen cepas de la subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Hyphomycetes*, por ejemplo, *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Verticillum*, *Arthomyces*, *Caldariomyces*, *Ulocladium*, *Embellisia*, *Cladosporium*, o *Dreschlera*, en particular, *Fusarium oxysporum* (DSM 2672), *Humicola insolens*, *Trichoderma reesei*, *Myrothecium verrucaria* (IFO 6113), *Verticillum alboatrum*, *Verticillum dahliae*, *Arthomyces ramosus* (FERM P-7754), *Caldariomyces fumago*, *Ulocladium chartarum*, *Embellisia alli*, o *Dreschlera halodes*.

[0245] Otros hongos preferidos incluyen cepas de la subdivisión *Basidiomycotina*, clase *Basidiomycotina*, 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* (anteriormente llamado *Polyporus*), por ejemplo, *T. versicolor* (p. ej., PR4 28-A).

[0246] Otros hongos preferidos incluyen cepas de la subdivisión *Zygomycotina*, clase *Mycoraceae*, por ejemplo, *Rhizopus* o *Mucor*, en particular, *Mucor hiemalis*.

[0247] Algunas bacterias preferidas incluyen cepas del orden *Actinomycetales*, por ejemplo, *Streptomyces spheroides* (ATCC 23965), *Streptomyces thermoviolaceus* (IFO 12382), o *Streptoverticillum verticillium* ssp. *verticillium*.

[0248] Otras bacterias preferidas incluyen *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodomonas palustri*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas purrocina* (ATCC 15958), *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-11) y cepas de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus pumilus* (ATCC 12905) y *Bacillus stearothermophilus*.

[0249] Otras bacterias preferidas incluyen cepas de *Myxococcus*, por ejemplo, *M. virescens*.

[0250] La peroxidasa puede también ser una que se produce por un método comprendiendo cultivo una célula huésped transformada con un vector de ADN recombinante que lleva una secuencia de ADN que codifica la peroxidasa al igual que secuencias de ADN para la expresión de la secuencia de ADN que codifica la peroxidasa, en un medio de cultivo bajo condiciones que permiten la expresión de la peroxidasa y recuperación la peroxidasa del cultivo.

[0251] En un aspecto preferido, una peroxidasa producida de manera recombinante es una peroxidasa derivada de un *Coprinus* sp., en particular, *C. macrorhizus* o *C. cinereus* según la WO 92/16634.

[0252] En la presente invención, compuestos que poseen actividad de peroxidasa comprenden enzimas peroxidasas y fragmentos activos de peroxidasa derivados de citocromos, hemoglobina, o enzimas peroxidasas.

[0253] Una unidad de peroxidasa (POXU) es la cantidad de enzima que bajo las siguientes condiciones cataliza la conversión de 1 μ mol de peróxido de hidrógeno por minuto a 30°C en 0,1 M de tampón de fosfato pH 7,0, 0,88 mM de peróxido de hidrógeno y 1,67 mM de 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). La reacción es seguida durante 60 segundos (15 segundos después de mezcla) por el cambio en la absorbancia a 418 nm, que debería estar en el intervalo de 0,15 a 0,30. Para cálculo de actividad, un coeficiente de absorción de ABTS oxidado de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ y una estequiometría de un μ mol de H₂O₂ convertida por dos μ mol de ABTS oxidado se usan.

Lacasas

[0254] En la presente invención, lacasas y enzimas relacionadas con la lacasa comprenden cualquier enzima lacasa clasificada como EC 1.10.3.2, cualquier enzima catecol oxidasa clasificada como EC 1.10.3.1, cualquier enzima bilirrubina oxidasa clasificada como EC 1.3.3.5, o cualquier enzima de monofenol-monoxigenasa clasificada como EC 1.14.18.1.

[0255] Las enzimas mencionadas arriba pueden ser microbianas, es decir, obtenidas de bacterias u hongos (incluyendo hongos filamentosos y levaduras), o pueden derivar de plantas.

[0256] 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* and *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinus*, e.g., *C. cinereus*, *C. comatus*, *C. friesii*, and *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).

[0257] Ejemplos adecuados de bacterias incluyen una lacasa obtenida de una cepa de *Bacillus*.

[0258] Una lacasa obtenida de *Coprinus*, *Myceliophthora*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Scytalidium* o *Rhizoctonia* es preferida; en particular, una lacasa obtenida de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Polyporus pinsitus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Scytalidium thermophilum*, o *Rhizoctonia solani*.

[0259] Lacasas comercialmente disponibles son NS51001 (una lacasa de *Polyporus pinsitius*, disponible de Novozymes A/S) y NS51002 (una lacasa de *Myceliophthora thermophila*, disponible de Novozymes A/S).

[0260] La lacasa o la enzima relacionada con la lacasa puede también ser una que se produce por un método comprendiendo cultivo de una célula huésped transformada con un vector ADN recombinante que lleva una secuencia de ADN que codifica la lacasa al igual que secuencias de ADN para la expresión de la secuencia de ADN que codifica la lacasa, en un medio de cultivo bajo condiciones que permiten la expresión de la enzima lacasa y recuperación de la lacasa del cultivo.

[0261] Actividad de la lacasa (LACU) se determina de la oxidación de siringaldazina bajo condiciones aeróbicas a pH 5,5. El color de violeta producido se fotometra a 530 nm. Las condiciones analíticas son 19 mM de siringaldazina, 23 mM de tampón acetato, pH 5,5, 30°C, 1 minuto de tiempo de reacción. Una unidad de lacasa (LACU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0 μ mol de siringaldazina por minuto bajo las condiciones anteriores.

[0262] La actividad de lacasa (LAMU) se determina de la oxidación de siringaldazina bajo condiciones aeróbicas a pH 7,5. El color de violeta producido se fotometra a 530 nm. Las condiciones analíticas son 19 mM de siringaldazina, 23 mM de tris/maleato pH 7,5, 30°C, 1 minuto de tiempo de reacción. Una unidad de lacasa (LAMU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0 μ mol de siringaldazina por minuto bajo las condiciones anteriores.

[0263] Los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar conjuntamente con las enzimas mencionadas anteriormente y/o proteínas celulolíticas para además degradar el componente de celulosa del sustrato de biomasa, (ver, por ejemplo, Brigham *et al.*, 1995, en *Handbook on Bioethanol* (Charles E. Wyman, editor), pp.119-141, Taylor & Francis, Washington D.C.; Lee, 1997, *Journal of Biotechnology* 56: 1-24).

Composiciones detergentes

[0264] Los polipéptidos de la presente invención con actividad de aumento celulolítica se pueden añadir y así convertirse en un componente de una composición detergente.

[0265] La composición detergente de la presente invención puede ser formulada, por ejemplo, como una composición de detergente para ropa de lavado a mano o a máquina que incluye una composición aditiva de lavandería adecuada para pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante añadida de enjuague, o ser formulada como una composición detergente para uso en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o ser formulada para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0266] En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo detergente comprendiendo un polipéptido de la invención. El aditivo detergente al igual que la composición detergente puede comprender una o más enzimas tal como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, por ejemplo, una lacasa y/o peroxidasa.

[0267] En general, las propiedades de la enzima(s) seleccionada deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes no enzimáticos y enzimáticos, etc.), y la enzima(s) debería estar presente en cantidades eficaces.

[0268] Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes modificados químicamente o creados genéticamente de proteína se incluyen. Celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0269] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas con beneficios de cuidado del color.

Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en las EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasas tales como las descritas en las WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

5 [0270] Celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinas™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

10 [0271] Proteasas: proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. Origen microbiano es preferido. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína se incluyen. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa alcalina microbiana o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisin, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, *subtilisin* Novo, *subtilisin* Carlsberg, *subtilisin* 309, *subtilisin* 147 y *subtilisin* 168 (descritas en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (p. ej., de origen bovino o porcino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

15 [0272] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

20 [0273] Enzimas proteásicas preferidas disponibles comercialmente incluyen Alcalase™, Savinase™, Primase™, Durafase™, Esperase™ y Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OXP™, FN2™ y FN3™ (Genencor Internacional Inc.).

25 [0274] Lipasas: lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína se incluyen. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois et al., 1993, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131: 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

30 [0275] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

35 [0276] Enzimas de lipasa preferidas disponibles comercialmente incluyen Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novozymes A/S).

40 [0277] Amilasas: amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína se incluyen. Amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839.

45 [0278] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

50 [0279] Amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor Internacional Inc.).

55 [0280] Peroxidasas/oxidasas: peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen aquellas de origen de planta, fúngico o bacteriano. Mutantes químicamente modificados o mutantes creados genéticamente de proteína se incluyen. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus* y variantes de estas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

[0281] Peroxidasas comercialmente disponibles incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

60 [0282] La enzima(s) detergente se puede incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados con una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado comprendiendo todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado, por ejemplo, como un granulado, líquido, composición acuosa, etc. Formulaciones de aditivo detergentes preferidas son granulados, en particular, granulados no polvorientos, líquidos, en particular, líquidos estabilizados, o compuestos acuosos.

65 [0283] Granulados no polvorientos pueden ser producidos, por ejemplo, como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden ser revestidos opcionalmente por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento

- cerosos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenoglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados con de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes etoxilados grasos en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuadas para aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenoglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.
- [0284] La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una pastilla, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente con hasta 70% de agua y 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.
- [0285] La composición detergente comprende uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o zwitteriónicos y/o catiónicos. Los tensioactivos están presentes típicamente a un nivel de 0,1 % a 60% en peso.
- [0286] Cuando se incluye en esto el detergente normalmente contiene de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un surfactante aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, metil éster alfa-sulfo ácido graso, ácido alquil o alquenilsuccínico, o jabón.
- [0287] Cuando se incluye en esto el detergente normalmente contiene de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un surfactante no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de polihidroxi alquil ácido graso, o derivados de N-acil N-alquil glucosamina ("glucamidas").
- [0288] El detergente puede contener 0-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilenodiaminatetraacético, ácido dietilenotriaminopentaacético, ácido alquil o alquenilsuccínico, silicatos solubles, o silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst).
- [0289] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenglicol), poli(vinil alcohol), poli(vinilpirrolidona-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de ácido de lauril metacrilato/acrílico.
- [0290] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiltilenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos del tipo, por ejemplo, amida, imida, o sulfona.
- [0291] La enzima(s) de la composición detergente de la invención puede ser estabilizada usando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenoglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenilborónico y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708.
- [0292] El detergente puede también contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como, por ejemplo, acondicionadores de tejido incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes de reposición antisuciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótopos, inhibidores de decoloración, o perfumes.
- [0293] En las composiciones detergentes, cualquier enzima se puede añadir en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.
- [0294] En las composiciones detergentes, un polipéptido de la presente invención con actividad de aumento celulolítica se puede añadir en una cantidad correspondiente a 0,001-100 mg de proteína, preferiblemente 0,005-50 mg de proteína, más preferiblemente 0,01-25 mg de proteína, incluso más preferiblemente 0,05-10 mg de proteína, de forma más preferida 0,05-5 mg de proteína, e incluso de forma más preferida 0,01-1 mg de proteína por litro de solución de lavado.
- [0295] Un polipéptido de la invención que tiene actividad de aumento celulolítica puede también ser incorporado en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202, que es por la presente incorporado como referencia.

Otros usos

[0296] En general, tratamiento de cualquier material de pared celular vegetal se puede aumentar por complementación de los polipéptidos de la presente invención con actividad de aumento celulolítica.

Péptido señal

[0297] La presente invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos comprendiendo un gen que codifica una proteína operativamente unida a una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en los nucleótidos 1 a 66 de la SEC ID n°: 1 que codifican un péptido señal que consiste en los aminoácidos 1 a 22 de la SEC ID n°: 2, que permite secreción de la proteína en un medio de cultivo, donde el gen es extranjero a la secuencia de ácidos nucleicos.

[0298] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes y células huésped recombinantes comprendiendo tales construcciones de ácidos nucleicos.

[0299] La presente invención también se refiere a métodos para producir una proteína comprendiendo: (a) cultivo de tal célula huésped recombinante bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína; y (b) recuperación de la proteína.

[0300] La proteína puede ser nativa o heteróloga a una célula huésped. El término "proteína" no se utiliza aquí para referirse a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos y proteínas. El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos que comprenden una combinación de secuencias polipéptidas completas o parciales obtenidas de al menos dos proteínas diferentes donde una o más puede ser heteróloga o nativa a la célula huésped. Proteínas además incluyen variantes alélicas de origen natural y creadas genéticamente de las proteínas anteriormente mencionadas y proteínas híbridas.

[0301] Preferiblemente, la proteína es una hormona o variante de esta, enzima, receptor o parte de este, anticuerpo o parte de este, o indicador. En un aspecto más preferido, la proteína es una oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, o ligasa. En un aspecto incluso más preferido, la proteína es una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa.

[0302] El gen se puede obtener de cualquier procariota, eucariota, u otra fuente.

[0303] La presente invención es posteriormente descrita por los siguientes ejemplos que deberían no ser interpretados como limitaciones del ámbito de la invención.

Ejemplos Materiales

[0304] Productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Cepas

[0305] Cepa de *Thermoascus aurantiacus* NN044936 T002-5 fue usada como la fuente de la familia polipeptídica con actividad de aumento celulolítica GH61. Cepa de *Aspergillus oryzae* JaL250 (WO 99/61651) fue usada para la expresión del polipéptido de *Thermoascus aurantiacus* con actividad de aumento celulolítica.

Medios

[0306] Medio de dextrosa de patata sólida para poner en placas de rutina y crecimiento de *Thermoascus aurantiacus* se compuso por litro de 39 gramos de agar de dextrosa de patata (Difco BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Medio líquido para crecimiento de cultivos de *Thermoascus aurantiacus* se compuso por litro de 24 gramos de caldo de dextrosa de patata.

[0307] Medio Luria-Bertani (LB) se compuso por litro de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Medio LB para colocación en placas fue preparado asimismo, pero contuvo además 15 g de agar por litro. 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosido (X-Gal; Gold Biotechnology, St. Louis, MO) se disolvió a una concentración de materia prima de 40 µg por ml en N,N'-dimetilformamida y rutinariamente se extendió sobre placas de LB para selección de colonia diferencial. Para condiciones de crecimiento selectivas, ampicilina se añadió a medios LB a una concentración final de 50-100 mg por litro.

[0308] Medio NNCYP se compuso por litro de 5,0 g de NH_4NO_3 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g de CaCl_2 , 2,5 g de ácido cítrico, 5,0 g de bacto-peptona, 1,0 g de extracto de levadura, metales traza COVE y suficiente K_2HPO_4 para conseguir el pH final de aproximadamente 5. Solución de metales traza Cove se compuso por litro de 0,04 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 10 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Ejemplo 1: Construcción de biblioteca de ADN genómico

[0309] Un matraz 500 ml disipado con 200 ml de medio NNCYP, pH 5,0 con 3% de glucosa fue inoculado con un tapón de agar de una placa de *Thermoascus aurantiacus* crecida en PDA. El cultivo creció durante toda la noche a 45°C con agitación a 170 r.p.m. Micelios fueron recogidos por filtración a través de un filtro Whatman #1 (Whatman Inc., Clifton NJ) y congelados en el nitrógeno líquido. Los micelios congelados fueron molidos en un polvo en un mortero enfriado y distribuidos a tubos de tapa de tornillo. El polvo fue suspendido en un volumen total de 40 ml de 50 mM tampón de CAPS-NaOH con 0,5% de dodecil sulfato de litio y 0,5 mM de EDTA. La suspensión fue colocada en placas a 60°C durante 2 horas y periódicamente se mezcló por inversión. Para esto se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) neutralizado y los tubos fueron mezclados en una rueda rotante a 37°C durante 2 horas. Después de centrifugado a 2500 r.p.m. durante 10 minutos en un rotor Sorvall H1000B (Kendro, Asheville NC), la fase acuosa fue reextraída y centrifugada como anteriormente. La fase acuosa de la segunda extracción fue portada a 2,5 M de acetato amónico y colocada a -20°C hasta congelación. Después de descongelación, el extracto fue centrifugado a 15.000 x g durante 20 minutos. El granuloso se descartó y los ácidos nucleicos en el sobrenadante se precipitaron por adición de 0,7 volúmenes de isopropanol. Después de centrifugado a 15.000 x g, el granuloso fue enjuagado tres veces con 70% de etanol, aire seco y disuelto en 1,0 ml de 0.1X TE. El granuloso disuelto fue otra vez precipitado por adición de acetato amónico a 2,0 M y etanol a 63%. El granuloso fue enjuagado dos veces con 70% de etanol, seco, y disuelto en 200 µl de 0.1X TE. Una vez en la solución, el ADN fue portado a 20 mM de KCl.

[0310] La genoteca genómica de *Thermoascus aurantiacus* fue construida usando un kit TOPO® Shotgun Subcloning (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA). ADN genómico fue cortado de forma aleatoria por pulverización bajo argón como recomendado por el fabricante. Selección de tamaño durante insertos 2,5-5,0 kb se hizo por electroforesis en gel preparatoria en un 1% de gel de agarosa en el tampón TAE.

[0311] ADN genómico fue clonado en pCR®4Blunt-TOPO y usado para transformar células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) según instrucciones del fabricante. Placas iniciales en el agar LB complementado con ampicilina y X-Gal como se ha descrito anteriormente, se usaron para estimar que aproximadamente 64.000 clones han sido generados. La biblioteca fue amplificada inmediatamente seguido de determinación de la graduación de clones recombinantes. Cada reacción de transformación fue usada para inocular 200 ml de medio LB con 100 µg de ampicilina por ml. Cultivos del frasco de agitación crecieron luego para saturación a 37°C durante toda la noche y ADN plásmido fue extraído por lisis alcalina y purificado usando un kit Qiagen Plasmid Maxi.

[0312] Bibliotecas amplificadas fueron posteriormente usadas para generar colonias para aislamiento de clones por retransformación y colocación en placas de células TOP10 de *E. coli* en el agar LB complementado con ampicilina y X-Gal como se ha descrito anteriormente. Recogida de colonia fue realizada usando un robot Q-Pix (Genetix, Hampshire, UK) según las instrucciones del fabricante. Un total de 22.353 colonias individuales fueron inicialmente escogidas en placas de 96 pocillos, luego cultivadas bajo las condiciones selectivas perfiladas en la sección de medios de arriba, y almacenadas como provisiones de glicerol a -80°C.

Ejemplo 2: Amplificación de círculo rodador e impresión de microarrays

[0313] Un método robótico para amplificación de círculo rodante (RCA) y dilución de producto fue desarrollado para uso en un robot BioMEK FX (Beckman Coulter, Brea, CA). Kits TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) fueron usados para RCA y el protocolo del fabricante fue seguido en el método robótico.

[0314] Reacciones RCA fueron realizadas en 9972 clones de la biblioteca. Placas de dilución de 348 pocillos duplicadas (Genemate, Kaysville, UT) fueron preparadas a partir de 9600 productos RCA de la biblioteca, y estos clones fueron impresos sobre portaobjetos de vidrio revestido de poli-L-lisina para hacer microarrays, representando aproximadamente 33 Mb de ADN clonado cada uno. Además, los genes de *Thermoascus aurantiacus* cbh1 (Nº de acceso AX657575) y de xynA (Nº de acceso AJ132635) fueron manchados como controles positivos, junto con los controles negativos se incluye vector pCR®4Blunt-TOPO vacío y RCA obtenido a partir de células de *E. coli* no transformadas. La impresión de array se llevó a cabo usando los métodos descritos en la patente US nº. 5,807,522.

Ejemplo 3: Fermentaciones y extracción de ARN

[0315] Todas las fermentaciones fueron llevadas a cabo en fermentadores Applikon de 2 litros que fueron alimentados por lotes con una fuente de carbono de bien 5,2% (p/v) de glucosa o 5,2% de celulosa. El medio basal fue NNCYP y cultivos de celulosa también contuvieron 0,4% de glucosa para facilitar crecimiento celular inicial. El pH fue controlado durante el curso de la fermentación por adición de hidróxido amónico o ácido fosfórico. La fermentación fue llevada a cabo a 42°C, pH 5, durante un periodo de aproximadamente 120 horas. Muestras de micelios fueron recogidas dentro de días 1 a 5 post-inóculo. Las muestras miceliales fueron rápidamente separadas del medio de cultivo por filtración a través de Miracloth™ (Calbiochem, San Diego, CA), y luego congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

[0316] Un kit FastRNA® (Q-BIOgene, Carlsbad, CA) se usó para extraer ARN de muestras de micelios después del protocolo del fabricante. Calidad de ARN fue evaluada por electroforesis en 1% de geles de agarosa en tampón TBE a 55V durante 1 a 1½ horas, o por análisis capilar electroforético que usa un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La cantidad fue medida por espectrofotometría UV y/o análisis en el bioanalizador Agilent 2100. Solo muestras de los días de fermentación 2, 3 y 4 consistentemente liberaron ARN de calidad suficiente para experimentos de microarray.

Ejemplo 4: Construcción de sonda fluorescente e hibridaciones de microarray

[0317] Rendimientos de ARN bajos de muestras de *Thermoascus aurantiacus* necesitaron el uso de un método de amplificación lineal (amplificación ARNa) para generar cantidades suficientes de ARN para hibridaciones de microarray. ARN fue amplificado y marcado fluorescentemente usando el kit mino Allyl MessageAmp™ aRNA (Ambion, Inc., Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0318] Brevemente, primera cadena ADNc fue generada de 2 µg de ARN total por transcripción inversa cebada con T7 Oligo(dT). Un cebador promotor T7 fue usado luego para sintetizar la segunda cadena de ADNc. ADNc bicatenarios fueron purificados y añadidos a una reacción de transcripción *in vitro* para producir copias múltiples de ARNa. Amino alil-dUTP fueron incorporados en el ARNa durante transcripción *in vitro* para facilitar etiquetación posterior con tintes de cianina fluorescentes. Los ARNa resultantes fueron purificados y marcados por acoplamiento directo de fluoróforos Cy3 y Cy5 (CyeDye Post Labeling Reactive Dyes, Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) a residuos de amino alil UTP modificados en el ARNa según las instrucciones del fabricante.

[0319] Sondas fluorescentes fueron combinadas, purificadas y secadas al vacío, luego fueron resuspendidas en 15,5 µl de agua y añadidas a lo siguiente: 3,6 µl de 20X SSC, 2,5 µl de 250 mM de HEPES (pH 7,0), 1,8 µl de poly-dA (500 µg/ml) y 0,54 µl de 10% de SDS. Antes de hibridación, la solución fue filtrada con un filtro 0,22 µm, calentada a 100°C durante 2 minutos y enfriada a temperatura ambiente.

[0320] Sondas (5 µg cada una de ARNa marcado Cy3 y Cy5) fueron aplicadas a microarrays bajo una cobertura de vidrio y colocadas en una cámara humedecida. Hibridación fue llevada a cabo durante toda la noche (15-16 horas) a 63°C. Antes de escaneado, los arrays fueron lavados consecutivamente en 1X SSC con 0,03% de SDS, 0,2X SSC, y 0,05X SSC, y centrifugados durante 2 minutos a 500 r.p.m. en un centrifugador de mesa (Sorvall R7, RTH-250 rotor; Asheville, NC para eliminar exceso de líquido).

[0321] Portaobjetos de microarray fueron visualizados usando un escáner Axon GenePix® 4000B (Axon Instruments, Inc., Union City, CA). Imagen y análisis de datos fueron luego realizados usando software GenePix® Pro 5.0 según las instrucciones del fabricante. Valores de intensidad de fluorescencia para puntos de microarray fueron medidos usando el software GenePix® y la proporción de intensidad Cy5 a Cy3 para cada punto fue calculada después de sustracción de fondo por defecto. Puntos para los que la proporción Cy5/Cy3 de intensidad fue 2,0 o superior en arrays replicados fueron seleccionados para análisis de secuencia de ADN.

[0322] Después de los análisis de microarray, clones de interés fueron seleccionados y aislados de las suspensiones de célula de glicerol almacenadas a -80°C. El ADN usado para secuenciación fue preparado por un procedimiento de lisis alcalina. Cada clon fue secuenciado usando cebadores inversos T7 y M13 (MWG Biotech, Inc., High Point, NC) que flanquean el polilígar del vector pCR®4Blunt-TOPO. La secuencia *de-novo* fue usada para diseñar cebadores que permitieron extensión de la secuencia conocida, y esta estrategia "primer walking" fue luego usada para obtener clon en toda su longitud. Identidades se buscaron primero al nivel de ADN usando un algoritmo blast(n) (Itschul *et al.*, 1990, *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410). Posteriormente, traducciones hipotéticas de la secuencia de ADN en cada uno de los seis marcos de lectura posibles fueron comparadas en entradas de bases de datos públicos (p. ej., SwissProt, SWall, Trembl, Genpept, and GenesepQ) usando fasty (Pearson *et al.*, 1997, *Genomics* 46: 24-36) y tblast(x) (Altschul *et al.*, 1990, *supra*).

Ejemplo 5: Construcción de vector de expresión pAILo2

[0323] Vector de expresión pAILo1 fue construido por modificación de pBANe6 (patente US 6,461,837), que comprende el promotor NA2-tpi, secuencia terminadora de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (terminador AMG) y gen de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* (amdS). Modificación de pBANe6 fue realizada primero por eliminación de tres sitios de restricción NcoI en las posiciones 2051, 2722 y 3397 pares de bases del marcador de selección amdS por mutagénesis de sitio dirigida. Todos los cambios fueron diseñados para ser "silenciosos" dejando la secuencia de proteína real del producto genético amdS sin cambiar. Eliminación de estos tres sitios fue realizada simultáneamente con un kit de mutagénesis dirigida GeneEditor (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante usando los cebadores siguientes (nucleótido subrayado representa la base cambiada):

AMDS3NcoMut (2050):

5'-GTGCCCCATGATACGCCTCCGG-3' (SEC ID nº: 3)

AMDS2NcoMut (2721):

5'-GAGTCGTATTTCCAAGGCTCCTGACC-3' (SEC ID nº: 4)

AMDS1 NcoMut (3396):

5'-GGAGGCCATGAAGTGGACCAACGG-3' (SEC ID nº: 5)

[0324] Un plásmido comprendiendo todos los tres cambios en la secuencia prevista fue luego sometido a mutagénesis dirigida, usando un kit de mutagénesis QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA), para eliminar el sitio de restricción NcoI al final del terminador AMG en la posición 1643. Los cebadores siguientes (nucleótido subrayado representa la base cambiada) fueron usados para mutagénesis:

Cebador superior para mutagenizar la secuencia del terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (AMG):

5'-CACCGTGAAAGCCATGCTCTTCCTTCGTGTAGAAGACCAGACAG-3' (SEC ID nº: 6)

Cebador inferior para mutagenizar la secuencia del terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (AMG):
5'-CTGGTCTTCTACACGAAGGAAAGAGCATGGCTTTCACGGTGTCTG-3' (SEC ID n°: 7)

[0325] El último paso en la modificación de pBANE6 fue la adición de un nuevo sitio de restricción NcoI en el principio del polilígar usando un kit de mutagénesis QuickChange y los cebadores siguientes (nucleótidos subrayados representan las bases cambiadas) para producir pAlLo1 (Figura 2).

Cebador superior para mutagenizar el promotor de amilasa de *Aspergillus niger* (NA2-tpi):

5'-CTATATACACAAGTGGATTACCATGGGCGCGCGCCGAGATC-3' (SEC ID n°: 8)

Cebador inferior para mutagenizar el promotor de amilasa de *Aspergillus niger* (NA2-tpi):

5'-GATCTGCGGCGCGGGCCCATGGTAAATCCAGTTGTGTATATAG-3' (SEC ID n°: 9)

[0326] El gen amdS de pAlLo1 fue cambiado con el gen pyrG de *Aspergillus nidulans*. Plásmido pBANE10 (Figura 3) fue usado como una fuente para el gen pyrG. Análisis de la secuencia de pBANE10 mostró que el marcador pyrG estuvo contenido dentro de un fragmento de restricción NsiI y no contiene ni sitios de restricción NcoI ni PacI. Ya que el amdS es también flanqueado por sitios de restricción NsiI la estrategia para cambiar el marcador de selección fue un simple cambio de fragmentos de restricción NsiI. ADN plásmido de pAlLo1 y pBANE10 fue digerido con la enzima de restricción NsiI y los productos purificados por electroforesis en gel de agarosa usando procedimientos estándar. El fragmento NsiI de pBANE10 con el gen pyrG fue ligado al esqueleto de pAlLo1 para reemplazar el fragmento NsiI original de ADN con el gen amdS. Clones recombinantes fueron analizados por digestión de restricción para determinar si estos tenían el inserto correcto y orientación correcta. Un clon con el gen pyrG transcrito en el sentido contrario a las agujas del reloj fue seleccionado. El nuevo plásmido fue designado pAlLo2 (Figura 4).

Ejemplo 6: Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae*

[0327] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados debajo fueron diseñados para amplificar por PCR un gen de *Thermoascus aurantiacus* que codifica una familia putativa GH61A de número de clon genómico 3. Un kit InFusion Cloning (BD Biosciences, Palo Alto, CA) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión, pAlLo2, sin necesidad para digestiones de restricción o ligamiento.

Cebador directo:

5'-CACAACTGGATTACCATGTCCTTTTCCAAG-3' (SEC ID n°: 10)

Cebador inverso:

5'-AGTCACCTCTAGTTATTAACCAGTATACAG-3' (SEC ID n°: 11)

Las letras en negrita representan secuencia codificante. La secuencia restante es homóloga a los sitios de inserción de pAlLo2.

[0328] Doscientos picomoles de cada uno de los cebadores de arriba fueron usados en una reacción PCR que consiste en ADN que representa el número 3 de clon genómico *Thermoascus aurantiacus* que contiene la secuencia codificante GH61A, 10 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8.8, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgSO₄, 0.1% de Tritón X-100, 200 µM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dTTP dGTP y dCTP) y 2 unidades de polimerasa de ADN VentR® (todas las enzimas PCR relacionadas y reactivos de New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, Inc., Beverly, MA), en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo a 95°C durante 1 minuto; 30 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos. El bloque de calor luego fue a un ciclo de mojado 4°C.

[0329] El fragmento fue luego clonado en el vector de expresión pAlLo2 que usa un kit Infusion Cloning según las instrucciones del fabricante. El vector fue digerido con NcoI y PacI bajo condiciones recomendadas por el fabricante. Los fragmentos fueron purificados usando un kit MinElute™ Reaction Cleanup (QIAGEN Valencia, CA). El fragmento de gen y el vector linealizado fueron ligados juntos en una reacción resultante en el plásmido de expresión pDZA2 (Figura 5) en el que transcripción del gen de la familia GH61A fue bajo el control del promotor NA2-tpi. Al plásmido pDZA2 le faltaban 152 pares de bases de pAlLo2. La reacción de ligamiento incluyó aproximadamente 100 ng de pAlLo2 digerido con NcoI y PacI, y 100 ng del producto PCR purificado de GH61A de *Thermoascus aurantiacus*. Condiciones de ligamiento fueron conforme al protocolo del fabricante del kit Infusion Cloning. Células *E. coli* XL1-Blue Subcloning-Grade Competent (Stratagene, La Jolla, CA) fueron transformadas con el producto de ligamiento. La identidad de la construcción fue confirmada por secuenciación del ADN de la secuencia codificante GH61A de plásmidos purificados de *E. coli* transformado. Un clon con el plásmido recombinante fue designado *E. coli* pDZA2-7.

Ejemplo 7: Caracterización de la secuencia genómica de *Thermoascus aurantiacus* que codifica un polipéptido de la familia GH61 con actividad de aumento celulolítica

[0330] Secuenciación del ADN del clon genómico 15 GH61A de *Thermoascus aurantiacus* fue realizada con un Applied Biosystems Model 3700 Automated DNA Sequencer usando química de terminador Big Dye versión 3.1 y química de dGTP (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) y estrategia de "primer walking". Secuencias de nucleótidos fueron ensambladas y comparadas usando el componente ContigExpress de paquete de software Vector NTI 8 Suite (Informax, Inc., Frederick, MD.).

[0331] La secuencia de nucleótidos (SEC ID n°: 1) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n°: 2) de polipéptido de *Thermoascus aurantiacus* con actividad de aumento celulolítica se muestran en la figura 1. La secuencia codificante codifica una proteína de 250 aminoácidos. La secuencia codificante es 799 pares de bases que incluye el codón de

terminación y se interrumpe por un único intrón de 46 pares de bases. La región de codificación es 48,7% G+C. Usando el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6), un péptido señal de 22 residuos de aminoácidos se predijo indicando que el polipéptido maduro contiene 228 aminoácidos.

5 [0332] Un alineamiento comparativo de secuencias de aminoácidos fue determinado usando un algoritmo blastp (Higgins, 1989, *Supra*) utilizando software Paracel BioView Workbench (Paracel, Pasadena, CA) con una matriz blosum62. Penalizaciones del espacio, existencia: 11, y extensión: 1, fueron empleados como parámetros de
10 alineamiento de emparejamiento. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Thermoascus aurantiacus* que codifica un polipéptido de la familia GH61 con actividad de aumento celulolítica compartió 67%, 63%, y 58% de identidad a las secuencias de aminoácidos deducidas de proteínas de la familia 61 de proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* AN1041.2 (número de acceso EAA65609), proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* AN7891.2 (número de acceso EAA59545) y proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* AN9524.2 (número de acceso EAA66740), respectivamente.

15 [0333] *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA) con plásmido pDZA2-7 fue depositado con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, como NRRL B-30704, con una fecha de depósito de 30 de enero 30 de 2004.

20 **Ejemplo 8: Expresión del gen de *Thermoascus aurantiacus* que codifica un polipéptido de la familia GH61A con actividad de aumento celulolítica en el *Aspergillus oryzae* JaL250**

[0334] Protoplastos de *Aspergillus oryzae* JaL250 fueron preparados según el método de Christensen *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422. Aproximadamente 1,5 µg de pDZA2 fue usado para transformar *Aspergillus oryzae* JaL250. Plásmido pAilO2 se realizó como control.

25 [0335] La transformación de *Aspergillus oryzae* JaL250 con pDZA2 liberó aproximadamente 11 transformantes. Diez de los transformantes fueron aislados en placas PDA individuales.

[0336] Placas PDA confluyentes de todos los transformantes fueron lavadas con 5 ml de Tween 20 0,01% e inoculadas separadamente en 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio 125 ml e incubadas a 34°C, 250 r.p.m.
30 Seis días después de la incubación, 5 µl de sobrenadante de cada cultivo fue analizado usando 8-16% de geles de tris-glicina SDS-PAGE (Invitrogen, Inc, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Análisis SDS-PAGE mostró una banda GH61A emigrada con un PM aparente ligeramente superior a 25 kDa para nueve de diez transformantes.

35 **Ejemplo 9: Caracterización de *Thermoascus aurantiacus* GH61A con actividad de aumento celulolítica**

[0337] Restos de maíz fueron pretratados en el departamento Energy National Renewable Energy Laboratory (NREL) usando ácido sulfúrico diluido. Las siguientes condiciones fueron usadas para el pretratamiento: 0,048 g de ácido sulfúrico / g biomasa seca a 190°C y 25% p/p de sólidos secos durante alrededor de 1 minuto. Según NREL, los sólidos insolubles en agua en los restos de maíz pretratado (PCS) contuvieron 52% de celulosa, 3,6% de hemicelulosa y 29,8% de lignina. Celulosa y hemicelulosa fueron determinadas por una hidrólisis de ácido sulfúrico de dos etapas con análisis
40 posterior de azúcares usando procedimiento analítico estándar de cromatografía líquida de alto rendimiento NREL #002. Lignina fue determinada gravimétricamente después de hidrólisis de la celulosa y fracciones de hemicelulosa con ácido sulfúrico usando procedimiento analítico estándar NREL #003. Antes de la hidrólisis enzimática, los PCS fueron lavados con un volumen grande de agua DDI; el peso en seco del lavado de agua PCS resultó ser 20,6%.

45 [0338] El polipéptido de *Thermoascus aurantiacus* GH61A fue expresado en el *Aspergillus oryzae* como se describe en el ejemplo 8, y el caldo fue centrifugado a 9500 x g y el sobrenadante luego fue concentrado usando una célula agitada de Amicon equipada con una membrana PM10 (Millipore, Billerica, MA) y desalado usando una columna Econo-Pac 10DG (BioRad Laboratories, Hercules, CA).

50 [0339] Hidrólisis de PCS (10 mg por ml de 50 mM de tampón de acetato sódico pH 5,0) fue llevada a cabo usando 1,1 ml de tubos Immunoware (Pierce, Rockford, IL) con un volumen de reacción total de 1,0 ml. El polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A fue evaluado para su capacidad para mejorar la capacidad hidrolítica de una preparación con celulasa derivada de fermentación de *Trichoderma reesei* que expresa una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 02/095014), de ahora en adelante llamada Tr/AoBG y obtenida de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca. Hidrólisis de
55 PCS fue realizada usando 2,5 mg de Tr/AoBG por gramo de PCS, complementado con 0,2 mg del polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A por gramo de PCS. Hidrólisis PCS fue realizada a 50°C (TS Autoflow CO2 Jacketed Incubator). Las reacciones fueron realizadas en duplicados y alícuotas tomadas durante el curso de la hidrólisis. Reacciones de hidrólisis PCS fueron detenidas mediante la mezcla una alícuota de 20 µl de cada hidrolizado con 180 µl de 0,11 M de NaOH (reactivo de parada). Diluciones apropiadas en serie fueron generadas para cada muestra y el contenido de
60 azúcar reductor se determinó usando un ensayo de hidrácida de ácido para-hidroxibenzoico (PHBAH, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) adaptado a un formato de microplaca de 96 pocillos como se describe abajo. Brevemente, una alícuota de 90 µl de una muestra apropiadamente diluida fue colocada en una microplaca de fondo cónica de 96 pocillos. Reacciones fueron iniciadas añadiendo 60 µl de 1,5% (p/v) de PHBAH en 2% de NaOH en cada pocillo. Placas fueron calentadas descubiertas a 95°C durante 10 minutos. A las placas se les permitió refrescar a temperatura ambiente (RT) y 50 µl de H₂O destilado se añadió a cada pocillo. Una alícuota de 100 µl de cada pocillo fue transferida a una placa de fondo plana de 96 pocillos y la absorbancia a A410 nm se midió usando un lector de microplaca
65

SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Estándares de glucosa (0,1-0,0125 mg/ml diluida con 0,4% de hidróxido sódico) fueron usados para preparar una curva estándar para traducir los valores A410nm obtenidos en los equivalentes de glucosa. Los equivalentes resultantes fueron usados para calcular el porcentaje de conversión de celulosa PCS para cada reacción.

[0340] El grado de conversión de celulosa a azúcar reductor (conversión; %) fue calculado usando la siguiente ecuación:

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

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

[0341] Conversión de celulosa por Tr/AoBG sola (2,5 mg/g PCS) o complementada con el polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A (0,2 mg por g de PCS) se resume en la tabla 1:

Tabla 1. Conversión de celulosa de tabla por Tr/AoBG solo o Tr/AoBG complementado con polipéptido de *Termonascus aurantiacus* GH61A a 50°C, pH 5,0 durante 115 horas

Prueba n°	Nombre	Carga, mg/ g de PCS	Conversión en 115 h, %
1	Tr/AoBG	2,5	74,6
2	<i>T. aurantiacus</i> GH61 A	0,2	< 0,7%
3	Tr/AoBG + <i>T. aurantiacus</i> GH61A	2,5+0,2	83,8
4	Tr/AoBG	3,5	82,4

[0342] La tabla 1 muestra que el polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A mejoró la actividad de Tr/AoBG en PCS. El polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A por sí mismo (0,2 mg por g de PCS) liberó solo una conversión de celulosa inferior a 0,7% después de 115 horas. Complementación de 0,2 mg del polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A a 2,5 mg de Tr/AoBG liberó una conversión de celulosa superior a aquella por 3,5 mg de Tr/AoBG, indicando que actividad de Tr/AoBG en PCS fue impulsada por el polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A, y que había efectos sinérgicos entre Tr/AoBG y el polipéptido de *T. aurantiacus* GH61A.

Depósito de material biológico

[0343] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, y le dio el siguiente número de acceso:

Depósito	Número de acceso	Fecha de depósito
Cepa de <i>E. coli</i> pDZA2-7	NRRL B-30704	30 de enero de 2004

[0344] La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendency de esta solicitud de patente a uno determinado por el comisario de patentes y marcas registradas para tener derecho a ellas bajo 37 C.F.R. §1.14 and 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 patentes extranjeras en países donde equivalentes de la presente solicitud, o su progenie son solicitados. No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogas de derecho resultante de las patentes concedidas por acción gubernamental.

[0345] La invención descrita y reivindicada aquí no está limitada en su alcance por los aspectos específicos aquí descritos, ya que estos aspectos están destinados como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención. Cualquier aspecto equivalente está destinado a estar dentro del campo de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas descritas y mostradas aquí serán aparentes a los expertos en la técnica de la descripción precedente. Tales modificaciones están destinadas también a entrar dentro del campo de las reivindicaciones anexas. En el caso de conflicto, la presente divulgación incluye descripciones controladas.

[0346] Varias referencias se citan aquí, las descripciones se incorporan por referencia en sus totalidad.

Listado de secuencias

[0347]

<110> Novozymes Biotech, Inc.

<120> polipéptidos con actividad de aumento celolítica y codificación de polinucleótidos de estos

<130> 10602.204-WO

<150> 60/542,614

<151> 2004-02-06

<160> 11

5 <170> Versión de patentIn 3.2

<210> 1

<211> 799

<212> ADN

10 <213> Thermoascus aurantiacus

<400> 1

```

atgtcctttt ccaagataat tgctactgcc ggcgttcttg cctctgcttc tctagtggct      60
ggccatggct tcgttcagaa catcgtgatt gatggtaaaa agtatgtcat tgcaagacgc      120
acataagcgg caacagctga caatcgacag ttatggcggg tatctagtga accagtatcc      180
atacatgtcc aatcctccag aggtcatcgc ctgggtctact acggcaactg atcttggatt      240
tgtggacggg actggatacc aaaccccaga tatcatctgc cataggggcg ccaagcctgg      300
agccctgact gctccagtct ctccaggagg aactggtgag cttcaatgga ctccatggcc      360
tgattctcac catggcccag ttatcaacta ccttgctccg tgcaatggtg attgttccac      420
tgtggataag acccaattag aattcttcaa aattgccgag agcgggtctca tcaatgatga      480
caatcctcct gggatctggg cttcagacaa tctgatagca gccacaaca gctggactgt      540
caccattcca accacaattg cacctggaaa ctatgttctg aggcattgaga ttattgctct      600
tcactcagct cagaaccagg atggtgcca gaactatccc cagtgcattca atctgcaggt      660
cactggaggt ggttctgata accctgctgg aactcttggg acggcactct accacgatac      720
cgatcctgga attctgatca acatctatca gaaactttcc agctatatca tccctgggtcc      780
tcctctgtat actggttaa                                          799

```

15

<210> 2

<211> 250

<212> PRT

<213> Thermoascus aurantiacus

20

<400> 2

```

Met Ser Phe Ser Lys Ile Ile Ala Thr Ala Gly Val Leu Ala Ser Ala
1           5           10           15

```

ES 2 389 442 T3

Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp Gly
20 25 30

Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser
35 40 45

Asn Pro Pro Glu Val Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly
50 55 60

Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Arg
65 70 75 80

Gly Ala Lys Pro Gly Ala Leu Thr Ala Pro Val Ser Pro Gly Gly Thr
85 90 95

Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val
100 105 110

Ile Asn Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ser Thr Val Asp Lys
115 120 125

Thr Gln Leu Glu Phe Phe Lys Ile Ala Glu Ser Gly Leu Ile Asn Asp
130 135 140

Asp Asn Pro Pro Gly Ile Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ala Asn
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Thr Thr Ile Ala Pro Gly Asn Tyr
165 170 175

Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gln Asn Gln Asp
180 185 190

Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Gln Val Thr Gly Gly
195 200 205

Gly Ser Asp Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr His Asp
210 215 220

Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gln Lys Leu Ser Ser Tyr
225 230 235 240

Ile Ile Pro Gly Pro Pro Leu Tyr Thr Gly
245 250

<210> 3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Aspergillus niger

5 <400> 3
 gtgccccatg atacgcctcc gg 22

<210> 4
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Aspergillus niger

<400> 4
 15 gagtcgtatt tccaaggctc ctgacc 26

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Aspergillus niger

<400> 5
 ggaggccatg aagtggacca acgg 24

<210> 6
 25 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Aspergillus niger

<400> 6
 30 caccgtgaaa gccatgctct ttccttcgtg tagaagacca gacag 45

<210> 7
 <211> 45
 <212> ADN
 35 <213> Aspergillus niger

<400> 7
 ctggtcttct acacgaagga aagagcatgg ctttcacggt gtctg 45

<210> 8
 <211> 44
 <212> ADN
 40 <213> Aspergillus niger

<400> 8
 45 ctatatacac aactggattt accatgggcc cgcggccgca gate 44

<210> 9
 <211> 44
 50 <212> ADN
 <213> Aspergillus niger

<400> 9
 55 gatctgcggc cgcgggccca tggtaaattcc agttgtgtat atag 44

<210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 60 <213> Thermoascus aurantiacus

<400> 10
 cacaactgga ttaccatgt cctttccaa g ???31

<210> 11
 65 <211> 30
 <212> ADN

ES 2 389 442 T3

<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 11

agtcacctct agttattaac cagtatacag

30

5

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de aumento celulolítica, seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2 y
 - (b) un polipéptido que es codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo al menos condiciones de astringencia altas con (i) los nucleótidos 67 a 796 de la SEC ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 67 a 796 de la SEC ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii).
2. Polipéptido según la reivindicación 1, con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o incluso al menos 97% de identidad con los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2.
3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°: 2.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consiste en la SEC ID n°: 2 o un fragmento de esta teniendo actividad de aumento celulolítica.
5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que consiste en los aminoácidos 23 a 250 de la SEC ID n°: 2.
6. Polinucleótido aislado comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según la reivindicación 1.
7. Construcción de ácidos nucleicos comprendiendo el polinucleótido según la reivindicación 6 operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en una célula huésped fúngica.
8. Vector de expresión recombinante comprendiendo la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 7.
9. Célula huésped recombinante fúngica comprendiendo la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 7.
10. Método para la producción del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 comprendiendo: (a) cultivo de una célula huésped fúngica comprendiendo una construcción de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
11. Método para la producción del polipéptido según cualquiera de reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula de planta transgénica comprendiendo un polinucleótido que codifica el polipéptido con actividad de aumento celulolítica bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
12. Planta transgénica, parte de planta o célula vegetal, que ha sido transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
13. Método para degradación o conversión de un material celulósico, comprendiendo: tratamiento del material celulósico con una cantidad eficaz de una proteína celulolítica en presencia de una cantidad eficaz del polipéptido con actividad de aumento celulolítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la presencia del polipéptido con actividad de aumento celulolítica aumenta la degradación del material celulósico en comparación con la ausencia del polipéptido con actividad de aumento celulolítica.
14. Método según la reivindicación 13, donde el método es un paso en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF).
15. Método según la reivindicación 13, donde el método es un paso de un proceso híbrido de hidrólisis y fermentación (HHF).

```

      M S F S K I I A T A G V L A S A S
1  ATGTCCTTTT CCAAGATAAT TGCTACTGCC GGC GTTCTTG CCTCTGCTTC
    L V A G H G F V Q N I V I D G K
51 TCTAGTGGCT GGCCATGGCT TCGTTCAGAA CATCGTGATT GATGGTAAAA
    K Y
101 AGTATGTCAT TGCAAGACGC ACATAAGCGG CAACAGCTGA CAATCGACAG
    Y G G Y L V N Q Y P Y M S N P P
151 TTATGGCGGG TATCTAGTGA ACCAGTATCC ATACATGTCC AATCCTCCAG
    E V I A W S T T A T D L G F V D G
201 AGGTCATCGC CTGGTCTACT ACGGCAACTG ATCTTGATT TGTGGACGGT
    T G Y Q T P D I I C H R G A K P G
251 ACTGGATACC AAACCCAGAG TATCATCTGC CATAGGGGCG CCAAGCCTGG
    A L T A P V S P G G T V E L Q W
301 AGCCCTGACT GCTCCAGTCT CTCCAGGAGG AACTGTTGAG CTTCAATGGA
    T P W P D S H H G P V I N Y L A P
351 CTCCATGGCC TGATTCTCAC CATGGCCAG TTATCAACTA CCTTGCTCCG
    C N G D C S T V D K T Q L E F F K
401 TGCAATGGTG ATTGTTCCAC TGTGGATAAG ACCCAATTAG AATTCTTCAA
    I A E S G L I N D D N P P G I W
451 AATTGCCGAG AGCGGTCTCA TCAATGATGA CAATCCTCCT GGGATCTGGG
    A S D N L I A A N N S W T V T I P
501 CTTCAGACAA TCTGATAGCA GCCAACAACA GCTGGACTGT CACCATTCCA
    T T I A P G N Y V L R H E I I A L
551 ACCACAATTG CACCTGGAAA CTATGTTCTG AGGCATGAGA TTATTGCTCT
    H S A Q N Q D G A Q N Y P Q C I
601 TCACTCAGCT CAGAACCAGG ATGGTGCCCA GAACTATCCC CAGTGCATCA
    N L Q V T G G G S D N P A G T L G
651 ATCTGCAGGT CACTGGAGGT GGTTCCTGATA ACCCTGCTGG AACTCTTGGA
    T A L Y H D T D P G I L I N I Y Q
701 ACGGCACTCT ACCACGATAC CGATCCTGGA ATTCTGATCA ACATCTATCA
    K L S S Y I I P G P P L Y T G *
751 GAAACTTTCC AGCTATATCA TCCCTGGTCC TCCTCTGTAT ACTGGTTAA

```

Fig. 1

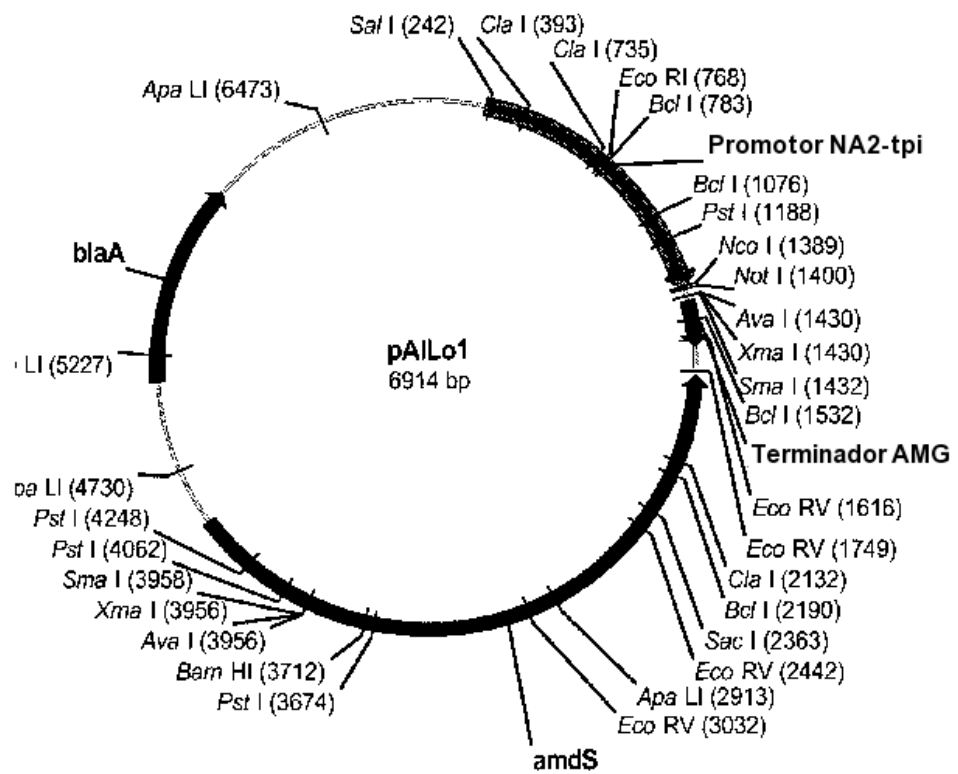


Fig. 2

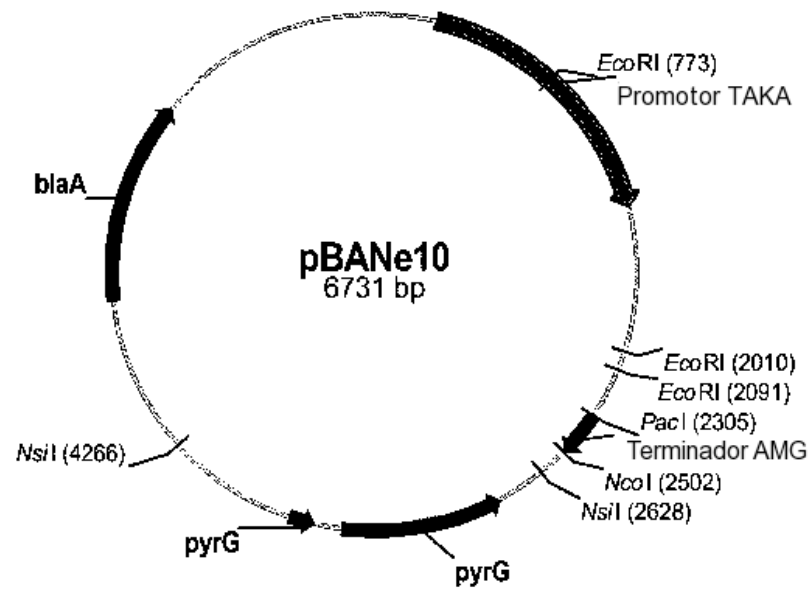


Fig. 3

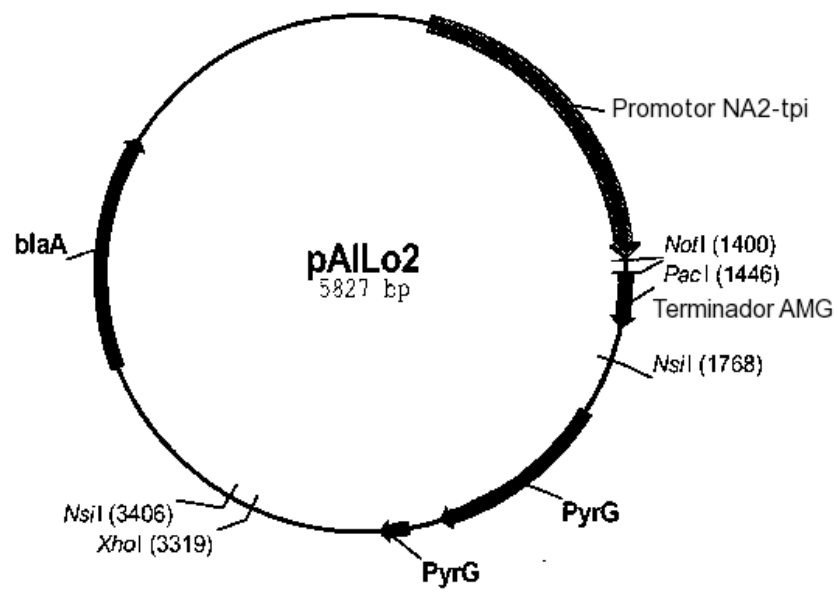


Fig. 4

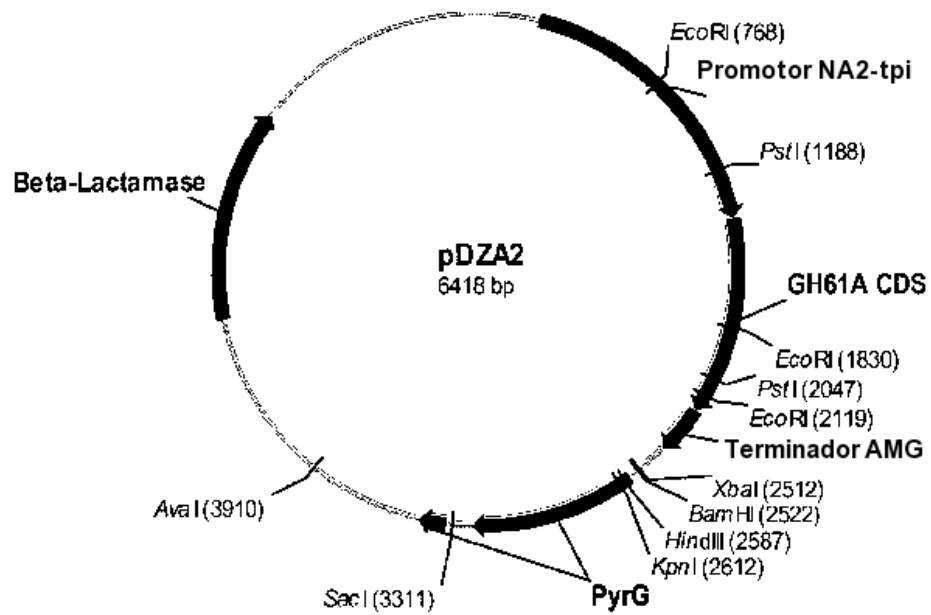


Fig. 5