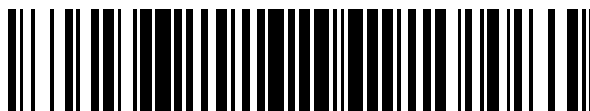


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 608**

51 Int. Cl.:

A23K 1/165 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2008 E 08858011 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2224822**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de esterasa de acetilxilano y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

06.12.2007 US 992995 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.09.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**MARANTA, MICHELLE y
BROWN, KIMBERLY**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 490 608 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de esterasa de acetilxilano y polinucleótidos que codifican los mismos.

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en un formato legible por ordenador. El formato legible por ordenador es incorporado en este documento mediante referencia.

10 Referencia a un depósito de Material biológico

[0002] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito de material biológico, este depósito es incorporado en este documento mediante referencia.

15 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

20 [0003] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de acetilxilano esterasa y polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos así como a métodos para producir y utilizar los polipéptidos.

Descripción de las técnicas relacionadas

25 [0004] Los polisacáridos de la pared celular vegetal constituyen generalmente el 90% de la pared celular vegetal y se pueden dividir en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina. La celulosa representa el constituyente principal de los polisacáridos de la pared celular. Las hemicelulosas son el segundo constituyente más abundante de las paredes celulares vegetales. El polímero principal de hemicelulosa es el xilano. La estructura de los xilanos encontrados en
30 paredes celulares vegetales puede diferir significativamente dependiendo de su origen, pero siempre contienen un esqueleto de D-xilosa enlazado en beta-1,4. El esqueleto de D-xilosa enlazado en beta-1,4 se puede sustituir por varios grupos laterales, tales como L-arabinosa, D-galactosa, acetilo, feruloilo, p-cumaroilo y residuos de ácido glucurónico.

[0005] La biodegradación del esqueleto de xilano depende de dos clases de enzimas: endoxilanasas y beta-xilosidasas. Las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) disocian el esqueleto de xilano en oligosacáridos más pequeños, que pueden ser
35 además degradados a xilosa por las beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37). Otras enzimas implicadas en la degradación de xilano incluyen, por ejemplo, acetilxilano esterasa, arabinasa, alfa-glucuronidasa, feruloil esterasa y esterasa de ácido p-cumárico.

40 [0006] La acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.6) elimina los grupos de O-acetilo de las posiciones 2 y/o 3 en los residuos beta-D- xilopiranosilo de acetilxilano. El acetilxilano juega un papel importante en la hidrólisis de xilano debido a que los grupos laterales acetilo pueden interferir estéricamente con la aproximación de las enzimas que disocian el esqueleto. La eliminación de los grupos laterales acetilo facilita la acción de las endoxilanasas. Un sistema de clasificación para
45 carbohidrato esterasas, basado en la similitud de secuencias, ha llevado a la definición de 13 familias, siete de las cuales contienen acetilxilano esterasas (Henrissat B., 1991, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat y Bairoch, 1996, Biochem. J. 316: 695-696).

[0007] Margolles-Clark et al., 1996, Eur. J. Biochem. 237: 553-560, describe una acetilxilano esterasa de *Trichoderma reesei*. Sundberg y Poutanen, 1991, Biotechnol. Appl. Biochem. 13: 1-11, describe la purificación y propiedades de dos
50 acetilxilano esterasas *Trichoderma reesei*. WO 2005/001036 describe un gen de acetilxilano esterasa de *Trichoderma reesei*. U.S. Patent nº 5,681,732 describe un gen de acetilxilano esterasa de *Aspergillus niger*. U.S. Patent nº 5,763,260 describe métodos para alterar las propiedades del xilano acetilado.

[0008] La patente japonesa nº JP2001054383 describe una acetilxilano esterasa de *Chaetomium gracile* y usa dicha
55 enzima en composiciones de pienso opcionalmente junto con otras enzimas descomponedoras de xilano.

[0009] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de acetilxilano esterasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

60 Resumen de la invención

[0010] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de acetilxilano esterasa seleccionados del grupo que consiste en:

65 (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 2;
(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido, que se hibrida al menos bajo condiciones de astringencia altas con (i)

la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii);
(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido, que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1; y

5

[0011] La presente invención también se refiere a polipéptidos que codifican polinucleótidos aislados que tienen actividad de acetilxilano esterasa, seleccionados del grupo que consiste en:

10

(a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2;

(b) un polinucleótido que se hibrida al menos bajo condiciones de astringencia altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii);

15

(c) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1; y

20

[0012] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos y métodos para producir un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa.

25

[0013] La presente invención también se refiere a métodos para inhibir la expresión de un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa en una célula, que comprenden administrar a la célula o expresar en la célula una molécula de ARN bicatenario (ARNdc), donde el ARNdc comprende una subsecuencia de un polinucleótido de la presente invención. La presente también se refiere a una molécula de ARN bicatenario (ARNdc) inhibitorio, donde opcionalmente el ARNdc es una molécula de ARNip o miARN.

30

[0014] La presente invención también se refiere a métodos para degradar un material que contiene xilano mediante un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa.

[0015] La presente invención también se refiere a plantas que comprenden un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa.

35

[0016] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido con acetilxilano esterasa, que comprende: (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar del polipéptido.

40

[0017] La presente invención además se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un gen que codifica una proteína, donde el gen está operativamente enlazado a una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID n°: 2, donde el gen es extranjero a la secuencia de nucleótidos.

Breve descripción de las figuras

45

[0018]

Las Figuras 1A y 1B muestran la secuencia de ADN genómico y la secuencia deducida de aminoácidos de una acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* DSM 1800 CE1 (SEC ID NOs: 1 y 2, respectivamente). Las secuencias intrónicas predichas se subrayan en negrita.

50

La Figura 2 muestra un mapa de restricción de pMMar6.

La Figura 3 muestra un mapa de restricción de pHinsAXE2.

Definiciones

55

[0019] Actividad de acetilxilano esterasa: el término "actividad de acetilxilano esterasa" se define en este documento como una actividad de carboxilesterasa (EC 3.1.1.72) que cataliza la hidrólisis de grupos acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, alfa-naftil acetato y p-nitrofenil acetato. Para los propósitos de la presente invención, la actividad de acetilxilano esterasa se determina según el procedimiento descrito en los ejemplos de este documento. Una unidad de actividad de acetilxilano esterasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de anión p-nitrofenolato por minuto en pH 5, a 25°C.

60

65

[0020] Los polipéptidos de la presente divulgación tienen al menos un 20%, preferiblemente al menos un 40%, de forma más preferible al menos un 50%, de forma más preferible al menos un 60%, de forma más preferible al menos un 70%, de forma más preferible al menos un 80%, incluso de forma más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95% e incluso de la forma más preferible al menos un 100% de la actividad de acetilxilano esterasa del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

- 5 [0021] Familia CE1 o CE1: el término "Familia CE1" o "CE1" se define aquí como un polipéptido que entra en la familia de la carbohidrato esterasa según Coutinho y Henrissat, (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat y B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, págs. 3-12.
- 10 [0022] Material que contiene xilano: el término "material que contiene xilano" se define aquí como cualquier material que comprende xilano como constituyente. El xilano es un polisacárido de pared celular vegetal que contiene un esqueleto de residuos de xilosa enlazado en beta-1,4. Las cadenas laterales de ácido 4-O-metilglucurónico y arabinosa están generalmente presentes en cantidades variables, junto con grupos acetilo y feruloilo. El xilano es un constituyente principal de la hemicelulosa.
- 15 [0023] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" tal y como se usa en este documento se refiere a un polipéptido que está aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polipéptido es al menos un 1% puro, preferiblemente al menos un 5% puro, de forma más preferible al menos un 10% puro, de forma más preferible al menos un 20% puro, de forma más preferible al menos un 40% puro, de forma más preferible al menos un 60% puro, incluso de forma más preferible al menos un 80% puro y de la forma más preferible al menos un 90% puro, tal como se determina mediante SDS- PAGE.
- 20 [0024] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota en este documento un preparado polipeptídico que contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, de forma más preferible como mucho un 6%, de forma más preferible como mucho un 5%, de forma más preferible como mucho un 4%, de forma más preferible como mucho un 3%, incluso de forma más preferible como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1% e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5% en peso de otro material polipeptídico con el cual esté asociado originalmente o por recombinación. Se prefiere, por lo tanto, que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos un 92% puro, preferiblemente al menos un 94% puro, de forma más preferible al menos un 95% puro, de forma más preferible al menos un 96% puro, de forma más preferible al menos un 97% puro, de forma más preferible al menos un 98% puro, incluso de forma más preferible al menos un 99% puro, de la forma más preferible al menos un 99,5% puro e incluso de la forma más preferible un 100% puro en peso del material polipeptídico total presente en el preparado. Los polipéptidos de la presente divulgación están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que el preparado polipeptídico está esencialmente libre de otro material polipeptídico con el cual esté asociado originalmente o por recombinación. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos clásicos de purificación.
- 25 [0025] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" se define en este documento como un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como procesamiento del N-terminal, truncamiento del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto preferido, el polipéptido maduro consiste en los aminoácidos 20 a 377 de la SEQ ID n°: 2 basándose en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID n°: 2 son un péptido señal.
- 30 [0026] Secuencia codificante del polipéptido maduro: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" se define en este documento como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto preferido, la secuencia codificante del polipéptido maduro consiste en los nucleótidos 58 a 1266 de la SEQ ID n°: 1 basándose en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice que los nucleótidos 1 a 57 de la SEQ ID n°: 1 codifican un péptido señal.
- 35 [0027] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".
- 40 [0028] Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal y como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son: penalización de apertura de gap de 10, penalización de extensión de gap de 0,5 y matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle catalogado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:
- 45 (Residuos Idénticos x100)/(Longitud de Alineamiento - N° Total de Gaps en el Alineamiento)
- 50 [0029] Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de desoxirribonucleótido se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) tal y como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son: penalización de apertura de gap de 10, penalización de extensión de gap de 0,5 y matriz de sustitución EDNAFULL
- 55
- 60
- 65

(versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle catalogado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos Idénticos x 100)/(Longitud de Alineamiento - N° Total de Gaps en el Alineamiento)

5

[0030] Secuencia homóloga: el término "secuencia homóloga" se define en este documento como una proteína predicha que tiene un valor de E (o puntuación de expectativa) inferior a 0,001 en una búsqueda tfasty (Pearson, W.R., 1999, en Bioinformatics Methods and Protocols, S. Misener and S. A. Krawetz, ed., págs. 185-219) con la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* de la SEQ ID n°: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

10

[0031] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define aquí como un polipéptido con uno o más (varios) aminoácidos delecionados del amino- y/o carboxilo- terminal del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2; o una secuencia homóloga de la misma; donde el fragmento tiene actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto preferido, un fragmento contiene al menos 310 residuos de aminoácidos, de forma más preferible al menos 325 residuos de aminoácidos y de la forma más preferible al menos 340 residuos de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2 o una secuencia homóloga de la misma.

15

[0032] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define en este documento como una secuencia de nucleótidos con uno o más (varios) nucleótidos delecionados de los extremos 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1; o una secuencia homóloga de la misma; donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto preferido, una subsecuencia contiene al menos 930 nucleótidos, de forma más preferible al menos 975 nucleótidos y de la forma más preferible al menos 1020 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1 o una secuencia homóloga de la misma.

20

[0033] Variante alélica: el término "variante alélica" denota en este documento cualquiera de las dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutaciones y puede dar lugar al polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

25

30

[0034] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" tal y como se usa en este documento se refiere a un polinucleótido que está aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polinucleótido es al menos un 1 % puro, preferiblemente al menos un 5% puro, de forma más preferible al menos un 10% puro, de forma más preferible al menos un 20% puro, de forma más preferible al menos un 40% puro, de forma más preferible al menos un 60% puro, incluso de forma más preferible al menos un 80% puro y de la forma más preferible al menos un 90% puro, tal y como se determina mediante electroforesis de agarosa.

35

[0035] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" tal como se usa en este documento se refiere a un preparado de polinucleótidos libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para usarse dentro de sistemas de producción de proteína diseñada genéticamente. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, de forma más preferible como mucho un 6%, de forma más preferible como mucho un 5%, de forma más preferible como mucho un 4%, de forma más preferible como mucho un 3%, incluso de forma más preferible como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1% e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el cual esté asociado originalmente o por recombinación. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones 5' y 3' no traducidas de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos un 90% puro, preferiblemente al menos un 92% puro, de forma más preferible al menos un 94% puro, de forma más preferible al menos un 95% puro, de forma más preferible al menos un 96% puro, de forma más preferible al menos un 97% puro, incluso de forma más preferible al menos un 98% puro, de la forma más preferible al menos un 99% puro e incluso de la forma más preferible al menos un 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que el preparado de polinucleótidos está esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual esté asociado originalmente o por recombinación. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

40

45

50

55

[0036] Secuencia codificante: cuando se usa en este documento, el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están 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 finaliza con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser una secuencia de nucleótidos de ADN, ADNc, sintética o recombinante.

60

[0037] ADNc: el término "ADNc" se define en este documento como una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa de una molécula de ARNm madura con empalmes obtenida de una célula eucariótica. El ADNc carece de las secuencias intrónicas que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor de ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de

65

aparecer como ARNm con empalmes maduro. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias intrónicas mediante un proceso llamado empalme. El ADNc derivado de ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia intrónica.

[0038] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácido nucleico tanto mono- como bi-catenario, que es aislada de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de forma que de otra manera no existirían en naturaleza o que serían sintéticos. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0039] Secuencias de control: el término "secuencia de control" se define en este documento para incluir todos los componentes que son necesarios 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 nativa o extranjera a cada una de las otras secuencias. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptidos, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de terminación traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlazadores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0040] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" denota en este documento una configuración en la que una secuencia de control se sitúa en una posición apropiada en relación a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótidos, tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0041] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitándose a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0042] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define en este documento como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que garantizan su expresión.

[0043] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este documento, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible a transformación, transfección, transducción y similares, con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

[0044] Modificación: el término "modificación" significa en este documento cualquier modificación química del polipéptido que consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2; o una secuencia homóloga de la misma; así como la manipulación genética del ADN que codifica tal polipéptido. La modificación puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción de uno o más (varios) aminoácidos así como el reemplazo de una o más (varias) cadenas laterales de aminoácidos.

[0045] Variante Artificial: cuando se usa en este documento, el término "variante artificial" significa un polipéptido que tiene actividad de acetilxilano esterasa producida por un organismo que expresa una secuencia de nucleótidos modificada de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1; o una secuencia homóloga de la misma. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana modificando la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID n°: 1; o una secuencia homóloga de la misma.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de acetilxilano esterasa

[0046] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que incluyen una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2 preferiblemente de al menos el 75%, de forma más preferible al menos el 80%, de forma más preferible al menos el 85%, incluso de forma más preferible al menos el 90%, de la forma más preferible al menos el 95%, e incluso de la forma más preferible al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, que tienen actividad de acetilxilano esterasa (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, de forma más preferible en cuatro aminoácidos, incluso de forma más preferible en tres aminoácidos, de la forma más preferible en dos aminoácidos e incluso de la forma más preferible en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[0047] Un polipéptido de la presente divulgación preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 2 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto preferido, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 2. En otro aspecto preferido,

el polipéptido comprende el polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende los aminoácidos 20 a 377 de la SEQ ID nº: 2, o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de acetilxilano esterasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende los aminoácidos 20 a 377 de la SEQ ID nº: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº: 2 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de acetilxilano esterasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en los aminoácidos 20 a 377 de la SEQ ID nº: 2 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de acetilxilano esterasa.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en los aminoácidos 20 a 377 de la SEQ ID nº: 2.

[0048] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de acetilxilano esterasa que son codificados por polinucleótidos que se hibridan preferiblemente bajo condiciones altas de astringencia (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria entera de (i); (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, Molecular cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York). Una subsecuencia de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 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 con actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria entera de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1.

[0049] La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID nº: 1; o una subsecuencia de la misma; así como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID nº: 2; o un fragmento de la misma; se pueden usar para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos con actividad de acetilxilano esterasa, de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocido en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADNc o el ADN genómico del género o especie de interés, siguiendo procedimientos Southern blot estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en ellos. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían ser al menos de 14, preferiblemente al menos de 25, de forma más preferible al menos de 35 y de la forma más preferible al menos de 70 nucleótidos de longitud. Se prefiere, no obstante, que la sonda de ácido nucleico sea de al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede ser al menos de 200 nucleótidos, preferiblemente al menos de 300 nucleótidos, de forma más preferible al menos de 400 nucleótidos o de la forma más preferible al menos de 500 nucleótidos de longitud. Sondas incluso más largas pueden ser utilizadas, por ejemplo, sondas de ácido nucleico que son preferiblemente al menos de 600 nucleótidos, de forma más preferible al menos de 700 nucleótidos, incluso de forma más preferible al menos de 800 nucleótidos o de la forma más preferible al menos de 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas son típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina). Tales sondas están incluidas en la presente invención.

[0050] Una biblioteca de ADN genómico o de ADNc preparada a partir de tales otras cepas puede, por lo tanto, ser seleccionada para ADN que se hibride con las sondas anteriormente descritas y codifique un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa. El ADN genómico o de otro tipo de tales otras cepas se puede separar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN homólogo a la SEQ ID nº: 1; o una subsecuencia de la misma; el material portador se usa preferiblemente en un Southern blot.

[0051] Para los propósitos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos se hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada, que corresponde a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1; la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1; su cadena complementaria entera; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas. Las moléculas con las que la sonda de ácido nucleico se hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, una película radiográfica.

[0052] En un aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico consiste en los nucleótidos 58 a 1266 de la SEQ ID nº: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de la SEQ ID nº: 2, o una subsecuencia de la misma. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la SEQ ID nº: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la secuencia de polinucleótidos contenida en el plásmido pHinsAXE2 que está contenido en E. coli NRRL B-50076, donde la secuencia de polinucleótidos de la misma codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la región de codificación del polipéptido maduro contenida en plásmido pHinsAXE2 contenido en E. coli NRRL B-50076.

[0053] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de 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 ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cortado y, o bien 25% formamida para astringencias muy bajas y bajas, o bien 35%

formamida para astringencias medias y medias-altas, o bien 50% formamida para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot durante 12 a 24 horas de manera óptima.

5 [0054] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente a 45°C (astringencia muy baja), de forma más preferible a 50°C (astringencia baja), de forma más preferible a 55°C (astringencia media), de forma más preferible a 60°C (astringencia media-alta), incluso de forma más preferible a 65°C (astringencia alta) y de la forma más preferible a 70°C (astringencia muy alta).

10 [0055] Para sondas cortas de aproximadamente 15 a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación y lavado post-hibridación a aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 10°C por debajo de la T_f calculada utilizando 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, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot durante 12 a 24 horas de manera óptima.

20 [0056] Para sondas cortas de aproximadamente 15 a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces durante 15 minutos cada una, usando 6X SSC de 5°C a 10°C por debajo de la T_f calculada.

25 [0057] En un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a polipéptidos aislados con actividad de acetilxilano esterasa codificados por polinucleótidos que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1 de preferiblemente al menos el 60%, de forma más preferible al menos el 65%, de forma más preferible al menos el 70%, de forma más preferible al menos el 75%, de forma más preferible al menos el 80%, de forma más preferible al menos el 85%, incluso de forma más preferible al menos el 90%, de la forma más preferible al menos el 95%, e incluso de la forma más preferible al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, que codifican un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa. Ver sección de polinucleótidos en este documento.

30 [0058] En un cuarto aspecto, la presente divulgación se refiere a variantes artificiales que comprenden una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2; o una secuencia homóloga de la misma. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que no afectan significativamente al plegado y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxilo-terminal, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazante pequeño de hasta aproximadamente 20 a 25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de enlace.

35 [0059] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el 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). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la 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 intercambios de ocurrencia más común 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/Nal, Ala/Glu y Asp/Gly.

40 [0060] Además de los 20 aminoácidos estándar, se pueden sustituir aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina, y serina de alfa-metilo) por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos no codificados por el código genético y aminoácidos no naturales se puede sustituir por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" han sido modificados después de la síntesis de proteínas y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales pueden ser sintetizados químicamente y, preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido pipecólico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

45 [0061] Alternativamente, los cambios en aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico-químicas de los polipéptidos son alteradas. Por ejemplo, los cambios en aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

50 [0062] Los aminoácidos esenciales en el polipéptido progenitor se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes son examinadas para actividad biológica (es decir, actividad de acetilxilano esterasa) para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Ver también, Hilton et al., 1996, J. Biol.

Chem. 271: 4699-4708. Se puede determinar también el sitio activo de la enzima u otra interacción biológica por análisis físico de la estructura, tal como se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitios 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 a partir de análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

[0063] Sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos individuales o múltiples pueden ser hechas y probadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de selección relevante, tal como aquellos descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988 Science 241: 53-57; Bowie y 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 propensa a error, despliegue de fagos (p. ej., Lowman et al., 1991, Biochem. 30:10832-10837; US Patent n° 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida (Derbyshire et al., 1986, Gene 46:145; Ner et al., 1988, DNA 7:127).

[0064] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos clonados mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden ser recuperadas de las células huésped y rápidamente secuenciadas usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

[0065] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2, tales como los aminoácidos 20 a 377 de la SEQ ID n°: 2, es 10, preferiblemente 9, de forma más preferible 8, de forma más preferible 7, de forma más preferible como mucho 6, de forma más preferible 5, de forma más preferible 4, incluso de forma más preferible 3, de la forma más preferible 2 e incluso de la forma más preferible 1.

Fuentes de polipéptidos con actividad de acetilxilano esterasa

[0066] Un polipéptido de la presente invención puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género. Para los propósitos de la presente invención, el término "obtenido de" tal como se utiliza en este documento en conexión con una fuente dada, significará que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos es producido por la fuente o por una cepa donde la secuencia de nucleótidos de la fuente ha sido insertada. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada es secretado extracelularmente.

[0067] Un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido gram positivo bacteriano tal como un polipéptido de Bacillus, Streptococcus, Streptomyces, Stafilococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Clostridium, Geobacillus u Oceanobacillus con actividad de acetilxilano esterasa, o un polipéptido gram negativo bacteriano tal como un polipéptido de E. Coli, Pseudomonas, Salmonella, Campylobacter, Helicobacter, Flavobacterium, Fusobacterium, Iliobacter, Neisseria o Ureaplasma con actividad de acetilxilano esterasa.

[0068] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis o Bacillus thuringiensis con actividad de acetilxilano esterasa.

[0069] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis o Streptococcus equi subespecie Zooepidemicus con actividad de acetilxilano esterasa.

[0070] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de Streptomyces achromogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus o Streptomyces lividans con actividad de acetilxilano esterasa.

[0071] Un polipéptido de la presente invención que tiene actividad de acetilxilano esterasa también puede ser un polipéptido fúngico y de forma más preferible un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de Candida, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces o Yarrowia con actividad de acetilxilano esterasa; o de forma más preferible un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de Acremonium, Agaricus, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Botryosphaeria, Ceriporiopsis, Chaetomidium, Chrysosporium, Claviceps, Cochliobolus, Coprinopsis, Coptotermes, Corynascus, Cryphonectria, Cryptococcus, Diplodia, Exidia, Filibasidium, Fusarium, Gibberella, Holomastigotoides, Humicola, Irpex, Lentinula, Leptosphaeria, Magnaporthe, Melanocarpus, Meripilus, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Piromyces, Poitrasia, Pseudoplectania, Pseudotriconympha, Rhizomucor, Schizophyllum, Scytalidium, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolipocladium, Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella o Xylaria con actividad de acetilxilano esterasa.

[0072] 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 acetilxilano esterasa.

5 [0073] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*,
10 *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albobilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*,
15 *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride* con actividad de acetilxilano esterasa.

[0074] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Humicola grisea*, *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa* con actividad de acetilxilano esterasa.

20 [0075] En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Humicola insolens* con actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido *Humicola insolens* DSM 1800 con actividad de acetilxilano esterasa, por ejemplo, el polipéptido que comprende el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

25 [0076] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas la invención abarca los estados imperfectos y perfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie por la que son conocidas. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

30 [0077] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en una variedad de colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

35 [0078] Además, tales polipéptidos pueden ser identificados y obtenidos de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas antes mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos de los hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. El polinucleótido puede luego ser obtenido seleccionando de forma similar de una biblioteca genómica o de ADNc de tal microorganismo. Una vez que una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido ha sido detectada con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas para aquellos cualificados en la técnica (ver, por
40 ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

[0079] Los polipéptidos de la presente divulgación también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona al N-terminal o al C-terminal del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce fusionando una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del (de los) mismo(s) promotor(es) y terminador(es).

50 [0080] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio se divide liberando el polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa de la proteína de fusión. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero no se limitan a, un sitio Kex2 que codifica el dipéptido Lys-Arg (Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-76; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381), un sitio Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg, que es dividido por una Proteasa de factor Xa después del residuo de arginina (Eaton et al., 1986, Biochem. 25: 505-512); un sitio Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, que es dividido por una enteroquinasa después de la lisina (Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987); un sitio His-Tyr-Glu o sitio His-Tyr-Asp, que es dividido por genenasa I (Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248); un sitio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que es dividido por trombina después de la Arg (Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48); un sitio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln- Gly, que es dividido por proteasa TEV después de la Gln (Stevens, 2003, supra); y un sitio Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que es dividido por una forma genéticamente modificada de proteasa de rinovirus humano 3C después de la Gln (Stevens, 2003, supra).

Polinucleótidos

65 [0081] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias

de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen actividad de acetilxilano esterasa de la presente invención.

[0082] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la SEQ ID n°: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia contenida en el plásmido pHinsAXE2 contenido en E. coli NRRL B-50076. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en los nucleótidos 58 a 1266 de la SEQ ID n°: 1. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro contenida en plásmido pHinsAXE2 contenido en E.coli NRRL B-50076. La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 2 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de la SEQ ID n°: 1 o la secuencia de codificación de polipéptido maduro de la misma en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de la SEQ ID n°: 1 que codifican fragmentos de la SEQ ID n°: 2 que tienen actividad de acetilxilano esterasa.

[0083] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden o consisten en al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[0084] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido son conocidas en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado 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 tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación de nucleótidos basada en secuencias (NASBA) pueden ser utilizados. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Humicola* u otro organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región codificante de polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0085] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1 preferiblemente de al menos un 75%, de forma más preferible al menos un 80%, de forma más preferible al menos un 85%, incluso de forma más preferible al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad, que codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa.

[0086] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente divulgación puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas no naturales del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir, de alguna manera diseñada, del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, las variantes artificiales que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o introduciendo sustituciones de nucleótidos 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 a la producción de la enzima, o introduciendo sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de la sustitución de nucleótidos, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0087] Será aparente a los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden hacerse fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y aun así resultar en un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido, codificados por un polinucleótido aislado de la invención y, por lo tanto, preferiblemente no sujetos a sustitución, pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de barrido de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, supra). En esta última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo positivamente cargado en la molécula y las moléculas mutantes resultantes son examinadas para actividad de acetilxilano esterasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Se pueden determinar también sitios de interacción sustrato-enzima por análisis de la estructura tridimensional como se determina mediante técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos et al.1992, supra; Smith et al., 1992, supra; Wlodaver et al., 1992, supra).

[0088] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente divulgación, que se hibridan bajo condiciones de astringencia muy bajas, preferiblemente condiciones de astringencia bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medias-altas, incluso de forma más preferible condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1 o (iii) una cadena

complementaria entera de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook et al., 1989, supra), tal y como se define en este documento. En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria entera de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.

5 [0089] La invención de la divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos (a) hibridando una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas, medias, medias-altas, altas o muy altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1 o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii); y (b) aislando el polinucleótido que se hibrida, que codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto
10 preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria entera de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.

Constructos de ácidos nucleicos

15 [0090] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

20 [0091] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una multitud de maneras para garantizar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de la inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

25 [0092] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora 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 promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median en 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 puede obtener de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.

30 [0093] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), el gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), el gen de penicilinasa de *Bacillus licheniformis* (penP), los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis* y el 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). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant
35 bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra.

40 [0094] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son los 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 awamorii*, 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 tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I 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*, xilanasas I de *Trichoderma reesei*, xilanasas II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-TPI (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y
45 promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

50 [0095] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactoquinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 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.

60 [0096] La secuencia de control puede también ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora se enlaza operativamente al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la

célula huésped elegida se puede utilizar en la presente invención.

5 [0097] Los 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 tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

10 [0098] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, supra.

15 [0099] La secuencia de control puede también ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder se enlaza operativamente al terminal 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula huésped elegida se puede utilizar en la presente invención.

[0100] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

20 [0101] Líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomices cerevisiae*.

25 [0102] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

30 [0103] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

35 [0104] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

40 [0105] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos enlazados al amino-terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una secuencia codificante de péptido señal enlazada de manera natural, en el marco de lectura de traducción, con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante de péptido señal que es extranjera a la secuencia codificante. La secuencia codificante de péptido señal extranjera puede ser requerida donde la secuencia codificante no contiene de manera natural una secuencia codificante de péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante de péptido señal extranjera puede simplemente reemplazar la secuencia codificante de péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped elegida, es decir, segregada a un medio de cultivo, se puede utilizar en la presente invención.

50 [0106] Secuencias de codificación de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias de codificación de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica NCIB 11837 de *Bacillus*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutrales de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y *Bacillus subtilis* prsA. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

60 [0107] Secuencias de codificación de péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias de codificación de péptido señal obtenidas 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 *Humicola lanuginosa*.

65 [0108] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.

[0109] En un aspecto preferido, el péptido señal comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID n°: 2. En

otro aspecto preferido, la secuencia codificante de péptido señal comprende o consiste en los nucleótidos 1 a 57 de la SEQ ID n°: 1.

5 [0110] La secuencia de control puede ser también una secuencia codificante de propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situados en el amino-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propéptido está generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido maduro activo mediante división catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia codificante de propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina (aprE) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (nprT) de *Bacillus subtilis*, factor-alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

15 [0111] Donde las secuencias tanto de péptido señal como de propéptido están presentes en el amino-terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al amino-terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situada junto al amino terminal de la secuencia de propéptido.

20 [0112] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan que la expresión del gen se active o se desactive 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.

25 En levadura, se pueden utilizar los sistemas ADH2 o GAL1. En hongos filamentosos, el promotor 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 aquellas que permiten amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dehidrofolato reductasa, que es amplificado en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

30 Vectores de expresión

35 [0113] La presente divulgación también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada traduccional y transcripcional. Los varios ácidos nucleicos y secuencias de control descritos en este documento se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, una secuencia de polinucleótidos de la presente invención se puede expresar insertando la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprenda 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 está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

45 [0114] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

50 [0115] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, es integrado en el genoma y replicado junto con el(los) cromosoma(s) en los que ha sido integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total que va a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

55 [0116] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten la fácil selección de células transformadas, modificadas, transducidas o similares. Una etiqueta seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

60 [0117] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como resistencia a ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero no se limitan a, amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfonitricina acetiltransferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato-reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa) y

trpC (antranilato sintasa), así como equivalentes de las mismas. Se prefieren, para usar en una célula de *Aspergillus*, los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

5 [0118] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un(os) elemento(s) que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

10 [0119] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10.000 pares de bases y de la forma más preferible de 800 a 10.000 pares de bases, que tengan un alto grado de identidad con la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

20 [0120] Para replicación autónoma, el vector puede comprender adicionalmente un origen de replicación habilitando al vector para replicarse de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador del plásmido que media la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "replicador del plásmido" u "origen de replicación" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que habilita a un plásmido o vector para replicarse *in vivo*.

30 [0121] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 permitiendo la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1 permitiendo replicación en *Bacillus*.

[0122] Ejemplos de orígenes de replicación para usar 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.

35 [0123] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa 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). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden lograr según los métodos descritos en WO 00/24883.

40 [0124] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un incremento 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 seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen de marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, pueden ser seleccionadas cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

45 [0125] Los procedimientos usados para ligar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos para aquel cualificado en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

50 Células huésped

[0126] La presente divulgación se refiere también a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención, las cuales se usan favorablemente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal auto-replicante tal y como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped depende en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

60 [0127] La célula huésped puede ser cualquier célula útil para la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, un procarionta o un eucariota.

65 [0128] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram positiva o gram negativa. Las bacterias gram positivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus* y *Oceanobacillus*. Las bacterias gram negativas incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*,

Ilyobacter, Neisseria y Ureaplasma.

- 5 [0129] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de Bacillus. Células de Bacillus útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis y Bacillus thuringiensis.
- 10 [0130] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus o Bacillus subtilis.
En un aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus amyloliquefaciens.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus clausii.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus licheniformis.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus subtilis.
- 15 [0131] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de Streptococcus. Células de streptococcus útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis y Streptococcus equi subespecie Zooepidemicus.
- 20 [0132] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptococcus equisimilis. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptococcus pyogenes. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptococcus uberis célula. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptococcus equi subespecie Zooepidemicus.
- 25 [0133] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de Streptomyces. Células de Streptomyces útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de Streptomyces achromogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus y Streptomyces lividans.
- 30 [0134] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptomyces achromogenes. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptomyces avermitilis. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptomyces coelicolor. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptomyces griseus. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Streptomyces lividans.
- 35 [0135] La introducción de ADN en una célula de Bacillus puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751) o por conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de E. coli puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557- 580) o electroporación (ver, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de Streptomyces puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplastos y electroporación (ver, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585) o por transducción (ver, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una Célula de pseudomonas puede, por ejemplo, ser efectuada por electroporación (ver, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una Célula de streptococcus puede, por ejemplo, ser efectuada por competencia natural (ver, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios. 68: 189-2070, por electroporación (ver, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). No obstante, cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped puede ser usado.
- 50 [0136] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta u hongo.
- 55 [0137] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Fúngico" como se utiliza en este caso incluye los fila Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (según es definido por Hawkswort et al., En, Ainswort and Bisby's Dictionary of Fungi, 8ª edición, 1995, CAB international, University Press, Cambridge, UK) así como los Oomycota (como se cita en Hawkswort et al., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, supra).
- 60 [0138] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este documento incluye levadura ascosporógena (Endomicetales), levadura basidiosporógena y levadura perteneciente a los Fungi Imperfecti (Blastomicetos). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, a efectos de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner,
- 65

F.A., Passmore, S.M. y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n°. 9,1980).

[0139] En un aspecto más preferido incluso, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0140] 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*.

[0141] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según es definido por Hawksworth et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos están generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es mediante injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0142] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0143] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcocroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *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* y *Trichoderma viride*.

[0144] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la 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 transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs 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

[0145] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivar una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Humicola*. En un aspecto más preferido, la célula es *Humicola insolens*. En el aspecto más preferido, la célula es *Humicola insolens* DSM 1800.

[0146] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped recombinante como se describe en este documento, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[0147] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped recombinante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutante que tiene al menos una

mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 2; y (b) recuperar el polipéptido.

5 [0148] En los métodos de producción de la presente divulgación, las células se cultivan en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación y fermentación a escala grande o a escala pequeña (incluyendo fermentaciones continuas, por lote, por lote alimentado o de estado sólido) en laboratorios o fermentadores industriales, realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido se exprese y/o aísle. El cultivo se desarrolla en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en 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 nutriente, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, puede ser recuperado de lisatos de células.

15 [0149] Los polipéptidos pueden ser detectados usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este documento.

20 [0150] El polipéptido resultante puede ser recuperado usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede ser recuperado del medio nutriente por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitándose a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

25 [0151] Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitándose a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Riden, editores, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

Plantas

35 [0152] La presente divulgación también se refiere a una planta, parte de la planta o célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido aislado que codifica a un polipéptido de la presente invención que tiene actividad de acetilxilano esterasa para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de la planta que contiene el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de alimentos o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, el sabor y las propiedades reológicas o para destruir un factor antinutricional.

40 [0153] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (un dicot) o monocotiledónea (un monocot). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de los prados (poa pratense, poa); hierbas forrajeras tales como Festuca, Lolium, césped templado, como Agrostis; y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

45 [0154] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja; y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como coliflor, semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado de Arabidopsis thaliana.

50 [0155] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo: epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares y meristemas. Compartimentos celulares específicos de la planta, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma se consideran también una parte de planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera que es una parte de la 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, endospermos, aleurona y tegumentos.

55 [0156] También incluido dentro del campo de la presente invención están los descendientes de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

60 [0157] La planta o célula vegetal transgénica que expresa un polipéptido de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En definitiva, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta o en el genoma cloroplástico y propagando la planta o célula vegetal modificada resultante a una planta o célula vegetal transgénica.

65

[0158] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado a secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de planta elegida. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable, útil para identificar células huésped en las que el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método usado para introducir el ADN).

[0159] La elección de las secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o tránsito se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea que el polipéptido se exprese. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica de desarrollo, fase o tejido, y el producto genético puede ser dirigido a un tejido o parte de planta específicos tales como semillas u hojas. Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0160] Para expresión constitutiva, se pueden usar los promotores 35S-CaMV, ubiquitina 1 de maíz y actina 1 de arroz (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 de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (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 el promotor de la glutelina, prolamina, globulina o 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 desconocido de proteína de semilla de Vicia faba (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo aceitoso de semilla (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor napA de proteína de almacenamiento de Brassica napus o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo; como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor de rbcS de arroz o tomate (Kiozuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus chlorella (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor del gen aldP del arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible por herida tal como el promotor pin2 de la 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 salinidad, o inducidos por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo: etanol, estrógenos, hormonas de planta tipo etileno, ácido abscísico, ácido giberélico y metales pesados.

[0161] Un elemento intensificador del promotor se puede usar también para lograr una expresión mayor del polipéptido de la presente divulgación en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu et al., 1993, *supra*, describen el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para intensificar la expresión.

[0162] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.

[0163] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

[0164] Actualmente, la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método elegido para generar dicotiledóneas transgénicas (para revisión ver Hooykas y Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38) y puede también ser usada para transformar monocotiledóneas, aunque se usan más frecuentemente otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método elegido para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o tungsteno revestidas con el ADN que se ha de transformar) de callos embriogénicos 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 la transformación de protoplastos, tal como es descrito por Omirulleh et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

[0165] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado en ellos el constructo de expresión son seleccionados y regenerados en plantas completas según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección tanto durante la regeneración como en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica de sitio del gen de selección, mediante una recombinasa específica.

[0166] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprenden (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

Eliminación o reducción de la actividad de acetilxilano esterasa

- 5 [0167] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un mutante de una célula madre, que comprende interrupción o delección de una secuencia de polinucleótidos, o una parte de la misma, que codifica un polipéptido de la presente invención, lo que provoca que la célula mutante produzca menos polipéptido que la célula madre cultivada bajo las mismas condiciones.
- 10 [0168] La célula mutante se puede construir reduciendo o eliminando la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente divulgación usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, inserciones, interrupciones, reemplazos o delecciones. En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos es inactivada. La secuencia de nucleótidos que va a ser modificada o inactivada puede ser, por ejemplo, la región de codificación o una parte de la misma, esencial para la actividad, o un elemento regulador requerido para la expresión de la región de codificación. Un ejemplo de tal secuencia de control o reguladora podría ser una secuencia promotora o una parte funcional de la misma, es decir, una parte que es suficiente para afectar a la expresión de la secuencia de nucleótidos. Otras secuencias de control para posible modificación incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, una secuencia de péptido señal, un terminador de transcripción y un activador transcripcional.
- 20 [0169] La modificación o inactivación de la secuencia de nucleótidos se puede realizar sometiendo la célula madre a mutagénesis y seleccionando células mutantes en las que la expresión de la secuencia de nucleótidos ha sido reducida o eliminada. La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, puede ser realizada, por ejemplo, usando un agente químico o físico mutagenizante adecuado, usando un oligonucleótido adecuado o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis se puede realizar usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes.
- 25 [0170] Ejemplos de un agente físico o químico mutagenizante adecuado para este fin incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico y análogos de nucleótido.
- 30 [0171] Cuando se usan tales agentes, la mutagénesis se realiza típicamente incubando la célula madre que va a ser mutagenizada, en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas, y filtrando y/o seleccionando células mutantes que exhiben expresión del gen reducida o nula.
- 35 [0172] La modificación o inactivación de la secuencia de nucleótidos se puede lograr introduciendo, sustituyendo o quitando uno o más (varios) nucleótidos en el gen o un elemento regulador requerido para la transcripción o traducción del mismo. Por ejemplo, los nucleótidos se pueden insertar o quitar para producir la introducción de un codón de terminación, la eliminación del codón de inicio o un cambio en el marco de lectura abierto. Tal modificación o inactivación se puede realizar mediante mutagénesis dirigida o mutagénesis generada por PCR según métodos conocidos en la técnica. Aunque, en principio, la modificación se puede realizar in vivo, es decir, directamente en la célula que expresa la secuencia de nucleótidos que va a ser modificada, se prefiere que la modificación sea realizada in vitro como en los ejemplos posteriores.
- 40 [0173] Un ejemplo de una manera conveniente de eliminar o reducir la expresión de una secuencia de nucleótidos por una célula se basa en técnicas de sustitución génica, delección génica o interrupción génica. Por ejemplo, en el método de interrupción génica, una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde a la secuencia endógena de nucleótidos se mutageniza in vitro para producir una secuencia de ácidos nucleicos defectuosa que es luego transformada en la célula madre para producir un gen defectuoso. Por recombinación homóloga, la secuencia de ácidos nucleicos defectuosa reemplaza a la secuencia de nucleótidos endógena. Puede ser deseable que la secuencia defectuosa de nucleótidos también codifique un marcador que se puede utilizar para seleccionar los transformantes en los que la secuencia de nucleótidos ha sido modificada o destruida. En un aspecto particularmente preferido, la secuencia de nucleótidos se interrumpe con un marcador seleccionable tal como los descritos en este documento.
- 45 [0174] Alternativamente, la modificación o inactivación de la secuencia de nucleótidos se puede realizar por técnicas antisentido o ARNi establecidas que utilizan una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos. Más específicamente, la expresión de la secuencia de nucleótidos por una célula puede reducirse o eliminarse introduciendo una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos del gen, que puede ser transcrita en la célula y es capaz de hibridarse con el ARNm producido en la célula. La cantidad de proteína traducida es de este modo reducida o eliminada, bajo condiciones que permiten a la secuencia de nucleótidos antisentido complementaria hibridarse con el ARNm.
- 50 [0175] La presente divulgación se refiere adicionalmente a una célula mutante de una célula madre que comprende una interrupción o delección de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o una secuencia de control de la misma, que provoca que la célula mutante produzca menos polipéptido o ningún polipéptido en comparación con la célula madre.
- 55
- 60
- 65

[0176] Las células mutantes deficitarias en el polipéptido así creadas son particularmente útiles como células huésped para la expresión de polipéptidos nativos y/o heterólogos. Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a métodos para producir un polipéptido nativo o heterólogo que comprenden: (a) cultivar la célula mutante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. El término "polipéptidos heterólogos" se define aquí como polipéptidos que no son nativos a la célula huésped, una proteína nativa donde se han hecho modificaciones para alterar la secuencia nativa o una proteína nativa cuya expresión es alterada de forma cuantitativa como resultado de una manipulación de la célula huésped mediante técnicas de ADN recombinante.

[0177] En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para generar un producto proteínico esencialmente libre de actividad de acetilxilano esterasa, fermentando una célula, que produce tanto un polipéptido de la presente invención como el producto proteínico de interés mediante adición de una cantidad eficaz de un agente capaz de inhibir la actividad de acetilxilano esterasa en el caldo de fermentación antes, durante, o después de que la fermentación haya sido completada; recuperando el producto de interés del caldo de fermentación; y opcionalmente sometiendo el producto recuperado a otra purificación.

[0178] En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para generar un producto proteínico esencialmente libre de actividad de acetilxilano esterasa mediante el cultivo de la célula bajo condiciones que permiten la expresión del producto, sometiendo el caldo de cultivo resultante a un tratamiento combinado de pH y temperatura para reducir sustancialmente la actividad de acetilxilano esterasa y recuperando el producto del caldo de cultivo. Alternativamente, el tratamiento combinado de pH y temperatura se puede realizar en un preparado enzimático recuperado del caldo de cultivo.

El tratamiento combinado de pH y temperatura puede opcionalmente usarse en combinación con un tratamiento con un inhibidor de acetilxilano esterasa.

[0179] Según este aspecto de la divulgación, es posible eliminar al menos el 60%, preferiblemente al menos el 75%, de forma más preferible al menos el 85%, todavía de forma más preferible al menos el 95% y de la forma más preferible al menos el 99% de la actividad de acetilxilano esterasa. La eliminación completa de la actividad de acetilxilano esterasa se puede obtener usando este método.

[0180] El tratamiento combinado de pH y temperatura es preferiblemente realizado a un pH en el rango de 2 a 4 ó 9 a 11 y una temperatura en el rango de al menos 60 a 70°C durante un periodo de tiempo suficiente para lograr el efecto deseado, donde típicamente, 30 a 60 minutos es suficiente.

[0181] Los métodos usados para cultivo y purificación del producto de interés se pueden realizar por métodos conocidos en la técnica.

[0182] Los métodos de la presente divulgación para generar un producto esencialmente libre de acetilxilano esterasa son de particular interés en la producción de polipéptidos eucarióticos, en particular proteínas fúngicas tales como enzimas. Las enzimas se pueden seleccionar de, por ejemplo, una enzima amilolítica, enzima lipolítica, enzima proteolítica, enzima celulolítica, oxidorreductasa o enzima degradadora de la pared celular vegetal. Ejemplos de tales enzimas incluyen aminopeptidasa, amilasa, amilogucosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, glucosa oxidasa, glucosidasa, haloperoxidasa, hemicelulasa, invertasa, isomerasa, lacasa, ligasa, lipasa, liasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, fenoloxidase, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transferasa, transglutaminasa o xilanasas.

Las células deficitarias de acetilxilano esterasa también se pueden usar para expresar proteínas heterólogas de interés farmacéutico tales como hormonas, factores de crecimiento, receptores y similares.

[0183] Se entiende que el término "polipéptidos eucarióticos" incluye no solo polipéptidos nativos, sino también aquellos polipéptidos, por ejemplo, enzimas, que han sido modificados mediante sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos; u otras modificaciones de este tipo para mejorar la actividad, termoestabilidad, tolerancia al pH y similares.

[0184] En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un producto proteínico esencialmente libre de actividad de acetilxilano esterasa que se produce mediante un método de la presente invención.

Métodos para Inhibir la Expresión de un Polipéptido con Actividad de Acetilxilano Esterasa

[0185] La presente invención también se refiere a métodos para inhibir la expresión de un polipéptido de la presente invención en una célula, que comprenden administrar a la célula o expresar en la célula una molécula de ARN bicatenario (ARNdc), donde el ARNdc comprende una subsecuencia de un polinucleótido de la presente invención. En un aspecto preferido, el ARNdc es aproximadamente de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos dúplex de longitud.

[0186] El ARNdc es preferiblemente un ARN pequeño de interferencia (ARNip) o un micro ARN (miARN). En un aspecto

preferido, el ARNdc es ARN pequeño de interferencia (ARNip) para inhibir la transcripción.
En otro aspecto preferido, el ARNdc es micro ARN (miARN) para inhibir la traducción.

[0187] La presente divulgación también se refiere a tales moléculas de ARN bicatenario (ARNdc), que comprenden una porción de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1 para inhibir la expresión de un polipéptido en una célula. Mientras la presente invención no esté limitada por cualquier mecanismo particular de acción, el ARNdc puede entrar en una célula y causar la degradación de un ARN monocatenario (ARNmc) de secuencias similares o idénticas, incluyendo ARNm endógeno. Cuando una célula es expuesta al ARNdc, el ARNm del gen homólogo es selectivamente degradado por un proceso llamado interferencia por ARN (ARNi).

[0188] Los ARNdc de la presente divulgación se pueden usar en terapias de silenciamiento génico. En un aspecto, la invención proporciona métodos para degradar selectivamente ARN utilizando los ARNdc de la presente invención. El proceso se puede practicar in vitro, ex vivo o in vivo. En un aspecto, las moléculas ARNdc pueden utilizarse para generar una mutación de pérdida de función en una célula, un órgano o un animal. Métodos para hacer y usar moléculas de ARNdc para degradar selectivamente ARN se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, US Patent nº 6,506,559; US Patent nº 6,511,824; US Patent nº 6,515,109; y US Patent nº 6,489,127.

Composiciones

[0189] La presente divulgación también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de acetilxilano esterasa de la composición ha sido incrementada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0190] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por un microorganismo perteneciente al género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; género *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 sarcocroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*; género *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o género *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0191] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar según métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de composición seca o líquida. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que va a ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0192] Se dan más adelante ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las cuales la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0193] La presente divulgación está también dirigida a métodos para usar los polipéptidos que tienen actividad de acetilxilano esterasa.

[0194] Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden usar para degradar o modificar las paredes celulares vegetales o cualquier material que contenga xilano originado a partir de paredes de células vegetales. Ejemplos de diferentes usos son descritos más adelante (ver, WO 2002/18561, para otros usos). La dosificación de los polipéptidos de la presente divulgación y otras condiciones bajo las cuales la preparación se usa puede ser determinada basándose en métodos conocidos en la técnica.

[0195] La degradación enzimática de xilano es facilitada mediante eliminación parcial o completa de las ramas laterales. Los polipéptidos de la presente divulgación son preferiblemente usados en conjunción con otras enzimas degradadoras de xilano tales como xilanasas, acetilxilano esterasas, arabinofuranosidasas, xilosidasas, feruloil esterasas, glucuronidasas y una combinación de las mismas, en procesos donde el xilano debe ser degradado. Por ejemplo, los grupos acetilo pueden ser eliminados por acetilxilano esterasas; grupos de arabinosa por alfa-arabinosidasas; los grupos feruloilo por feruloil esterasas y los grupos de ácido glucurónico por alfa-glucuronidasas. Los oligómeros

liberados por xilanasas o por una combinación de xilanasas y enzimas hidrolizantes de ramas laterales, pueden ser adicionalmente degradados a xilosa libre por beta-xilosidasas. Un polipéptido de la presente invención es preferiblemente un componente de una composición que comprende una o más (varias) enzimas degradadoras de xilano, en particular xilanasas. En los varios usos descritos posteriormente, un polipéptido de la presente invención es preferiblemente usado en combinación con una o más (varias) enzimas degradadoras de xilano.

[0196] Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a métodos para degradar un material con xilano, que comprenden tratar el material que contiene xilano con tal polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa. En un aspecto preferido, el material que contiene xilano es adicionalmente tratado con un enzima degradadora de xilano. La enzima degradadora de xilano se puede seleccionar del grupo que consiste en una xilanasas, una acetilxilano esterasa, una feruloil esterasa, una arabinofuranosidasa, una xilosidasa, una glucuronidasa y una combinación de las mismas.

[0197] El material vegetal puede ser degradado para mejorar diferentes tipos de procesado, facilitar la purificación o extracción de componentes que no sean xilanos, como la purificación de beta-glucano u oligómeros de beta-glucano de cereales, mejorar el valor forrajero, reducir la capacidad enlazante del agua, mejorar la degradabilidad en plantas de aguas residuales, mejorar la conversión de, por ejemplo, hierba y maíz para ensilar, etc. Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden utilizar en la hidrólisis enzimática de varios materiales derivados de pared de célula vegetal o materiales de desecho, por ejemplo, de la producción de papel, o residuos agrícolas tales como paja de trigo, mazorcas de maíz, fibra de maíz, plantas enteras de maíz, cáscaras de nuez, hierba, cáscaras vegetales, vainas de judías, residuo de grano, pulpa de remolacha azucarera y similares. Los polipéptidos también se pueden usar para modificar la viscosidad de material derivado de pared celular vegetal. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden utilizar para reducir la viscosidad del material que contiene xilano, para promover el procesado de material que contiene xilano viscoso, como en la separación de trigo.

[0198] Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden usar con actividad limitada de otras enzimas xilanólíticas para degradar xilanos para la producción de oligosacáridos. Los oligosacáridos se pueden utilizar como agentes de aumento de volumen, como los oligosacáridos de arabinoxilano liberados a partir de material de pared celular de cereal o de arabinoxilanos más o menos purificados de cereales.

[0199] Los polipéptidos de la presente divulgación también se puede usar en combinación con otras enzimas xilanólíticas para degradar xilanos a xilosa y otros monosacáridos (US Patent nº 5,658,765). La xilosa liberada se puede convertir en otros compuestos.

[0200] Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden usar para degradar biomasa lignocelulósica o convertirla en azúcares fermentables para la producción de, por ejemplo, combustible, etanol potable y/o productos de fermentación (por ejemplo, ácidos, alcoholes, cetonas, gases y similares). Los polipéptidos son preferiblemente usados en combinación con otras enzimas degradadoras de xilano y una composición de celulasa (endoglucanasa(s); celobiohidrolasa(s) y beta-glucosidasa(s)).

[0201] Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden utilizar junto con otras enzimas como glucanasas para mejorar la extracción de aceite de material vegetal rico en aceite, como aceite de maíz de embriones de maíz.

[0202] Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden usar en horneados para mejorar el desarrollo, elasticidad, y/o estabilidad de la masa y/o el volumen, la estructura de la miga, y/o propiedades de antiendurecimiento del producto horneado. Los polipéptidos se pueden utilizar para el preparado de masa o productos horneados obtenidos a partir de cualquier tipo de harina o grano (por ejemplo, basados en trigo, centeno, cebada, avena o maíz). Los productos horneados producidos con un polipéptido de la presente invención incluyen pan, bollos, baguettes y similares. Para propósitos de horneado, un polipéptido de la presente invención se puede utilizar como la única o la principal actividad enzimática, o se puede utilizar en combinación con otras enzimas tales como una xilanasas, una lipasa, una amilasa, una oxidasa (por ejemplo, glucosa-oxidasa, peroxidasa), una lacasa y/o una proteasa.

[0203] Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden usar para modificar piensos para animales y pueden ejercer su efecto tanto in vitro (modificando componentes del pienso) como in vivo. Los polipéptidos se pueden añadir a composiciones de piensos para animales que contienen altas cantidades de arabinoxilanos y glucuronoxilanos, por ejemplo, piensos que contienen cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena o maíz. Cuando se añada al pienso, el polipéptido mejorará la descomposición in vivo del material de la pared celular vegetal, en parte debido a una reducción de la viscosidad intestinal (Bedford et al., 1993, Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition, págs. 73-77), por lo que se consigue una utilización mejorada de los nutrientes de la planta por parte del animal. Así, la tasa de crecimiento y/o proporción de conversión de pienso (es decir, el peso de pienso ingerido con respecto al aumento de peso) del animal son mejorados.

[0204] Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden usar en la industria del papel y pulpa, entre otros en los procesos de blanqueo para mejorar la claridad de pulpas de papel blanqueadas mediante los cuales se reduce la cantidad de cloro usada en las etapas de blanqueo, y para aumentar el refinado de las pulpas de papel en el proceso de reciclaje de papel (Eriksson, 1990, Wood Science and Technology 24: 79-101; Paice et al., 1988, Biotechnol. and Bioeng. 32: 235-239 y Pommier et al., 1989, Tappi Journal 187-191). Además, los polipéptidos se pueden utilizar para

el tratamiento de pulpa lignocelulósica para mejorar la capacidad de blanqueo de la misma. El tratamiento de la pulpa lignocelulósica puede ser realizado, por ejemplo, como se describe en US Patent nº 5,658,765, WO 93/08275, WO 91/02839 y WO 92/03608.

5 [0205] Los polipéptidos de la presente divulgación también se puede usar en elaboración de cerveza, en particular para mejorar la filtrabilidad del mosto, que contiene, por ejemplo, cebada y/o malta de sorgo (WO 2002/24926). Los polipéptidos se pueden utilizar de la misma manera como pentosanasas, convencionalmente usadas para la elaboración de cerveza, por ejemplo como es descrito por Viëtor et al., 1993, J. Inst. Brew. 99: 243-248; y EP 227159. Además, los polipéptidos se pueden utilizar para el tratamiento de bagazo, es decir, residuos de producción de mosto de cerveza que
10 contienen cebada o cebada malteada u otros cereales, para mejorar la utilización de los residuos para, por ejemplo, pienso para animales.

[0206] Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden utilizar para separar componentes de materiales de células vegetales, en particular de componentes de cereal tales como componentes de trigo. De particular interés es la
15 separación de trigo en gluten y almidón, es decir, componentes de interés comercial considerable. El proceso de separación se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica, convenientemente llamado proceso de bateo(o proceso de molienda húmeda) realizado como un proceso de hidrociclón o de decantador. En el proceso de bateo, la materia prima es una dispersión bombeable diluida del material vegetal, como el trigo que va a ser sometido a separación. En un proceso de separación de trigo la dispersión está hecha normalmente de harina de trigo y agua.

20 [0207] Los polipéptidos de la divulgación también se pueden usar en el preparado de zumo de frutas o vegetales para aumentar la producción.

[0208] Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden usar como componentes de un sistema de
25 descrudado enzimático para textiles.

[0209] Los polipéptidos de la presente divulgación también se pueden usar en aplicaciones de detergente para ropa en combinación con otras funciones enzimáticas.

30 Péptido señal

[0210] La presente divulgación también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un gen que codifica una proteína, donde el gen está operativamente enlazado a una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID nº: 2, donde el gen es extranjero a la
35 secuencia de nucleótidos.

[0211] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en los nucleótidos 1 a 57 de la SEQ ID nº: 1.

40 [0212] La presente divulgación también se refiere a vectores de expresión recombinantes y células huésped recombinantes que comprenden tales constructos de ácidos nucleicos.

[0213] La presente invención también se refiere a métodos para producir una proteína, que comprenden (a) cultivar tal célula huésped recombinante bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína; y (b) recuperar la proteína.
45

[0214] La proteína puede ser nativa o heteróloga a una célula huésped. El término "proteína" en este documento no pretende 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 de polipéptidos completas o parciales obtenidas de al menos dos proteínas diferentes donde una o más (varias) pueden ser heterólogas o nativas a la célula huésped. Las proteínas incluyen además variaciones diseñadas y variaciones alélicas de origen natural de las proteínas anteriormente mencionadas y proteínas híbridas.
50

[0215] Preferiblemente, la proteína es una hormona o variante de la misma, una enzima, receptor o porción del mismo, anticuerpo o parte del mismo, o un indicador. En un aspecto más preferido, la proteína es una oxidorreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa o ligasa. En un aspecto incluso más preferido, la proteína es una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, otra lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas.
60

[0216] El gen puede ser obtenido de cualquier procariota, eucariota u otra fuente.

[0217] La presente invención es adicionalmente descrita por los siguientes ejemplos, que no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención.
65

Ejemplos

Materiales

5 [0218] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad de reactivo.

Cepas

10 [0219] Se usó *Humicola insolens* DSM 1800 como fuente de un gen de la familia CE1 que codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa. Se usó la cepa MBin120 de *Aspergillus niger* (WO 2004/090155) para la expresar el gen de *Humicola insolens* que codifica el polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa.

Medios

15 [0220] Las placas PDA estaban compuestas de 39 g de agar papa dextrosa por litro.

[0221] El medio YP estaba compuesto de 10 g de extracto de levadura y 20 g de bacto-peptona por litro.

20 [0222] Las placas urea- acetamida+ COVE A estaban compuestas de 20 ml de una solución salina COVE A, 220 g de sorbitol, 10 g de glucosa, 10 ml de acetamida 1 M y 30 g de bacto-agar; pH 5,2 por litro.

[0223] La solución salina COVE A estaba compuesta de 26 g de KCl, 26 g de MgSO₄, 76 g de KH₂ PO₄ y 50 ml de una solución de oligoelementos COVE A por litro.

25 [0224] La solución de oligoelementos COVE estaba compuesta de 0,04 g de Na₂ B₄ O₇ · 10H₂ O, 0,4 g de CuSO₄ · 5H₂ O, 1,2 g de FeSO₄ · 7H₂ O, 0,7 g de MnSO₄ · H₂ O, 0,8 g de Na₂ MoO₄ · 2H₂ O y 10 g de ZnSO₄ · 7H₂ O por litro.

30 [0225] El medio M410 estaba compuesto de 50 g de maltosa, 50 g de glucosa, 2 g de MgSO₄ · 7H₂ O, 2 g de KH₂ PO₄, 4 g de polvo anhidro de ácido cítrico, 8 g de extracto de levadura, 2 g de urea, 0,5 g de una solución de oligoelementos AMG y 0,5 g de CaCl₂; pH 6,0 por litro.

[0226] Una solución de oligoelementos AMG estaba compuesta de 14,3 g de ZnSO₄ · 7H₂ O, 2,5 g de CuSO₄ · 5H₂ O, 0,5 g de NiCl₂ · 6H₂ O, 13,8 g de FeSO₄ · 7H₂ O, 8,5 g de MnSO₄ · 7H₂ O y 3 g de ácido cítrico por litro.

35 [0227] El medio LB estaba compuesto de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl por litro.

Ejemplo 1: Identificación de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens*

40 [0228] Fraccionamiento proteínico de ULTRAFLO® L. Una alícuota de 2 ml de ULTRAFLO® L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) se cambió primero de tampón a acetato de sodio 20 mM, pH 5 con 150 mM de cloruro sódico, usando una columna de desalación HIPREP™ 26/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). El material cambiado de tampón resultante (18,5 ml) fue luego concentrado a 3 ml usando ultrafiltración con una columna centrifugadora VIVASPIN® 20 con una membrana de peso molecular límite de 3000 Dalton (Vivascience AG, Hannover, Alemania). Una alícuota de 2 ml del material de ULTRAFLO® L cambiado de tampón y concentrado fue entonces fraccionada mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de exclusión por tamaño de HILOAD™ 26/60 SUPERDEX™ 200 prep grade (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) mediante elución isocrática con el mismo tampón. Las fracciones que mostraban absorbancia UV a 280 nm fueron combinadas en seis depósitos separados, de tiempos de elución variable, que variaban de 20 a 40 ml de volumen total cada uno. Las fracciones agrupadas fueron concentradas de 1 a 5 ml usando ultrafiltración con una columna centrifugadora VIVASPIN® 20 con una membrana de peso molecular límite de 3000 Dalton. Veinte µl de cada fracción agrupada concentrada fueron separados en un gel CRITERION™ de Tris-HCl SDS-PAGE 8-16% (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) según las condiciones sugeridas por el fabricante. Se usaron los estándares de PRECISION PLUS PROTEIN™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) como marcadores de peso molecular. El gel fue teñido con colorante proteínico azul de coomassie (G250) (BIO-SAFE™ Coomassie Stain, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) y se cortaron bandas visibles con una hoja de afeitar para el análisis de identificación de proteínas.

60 [0229] Digestión en gel de los polipéptidos para secuenciación de péptidos. Se usó un robot de manipulación de líquidos MULTIPROBE® II (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) para realizar las digestiones en gel. Una banda de gel de proteína de 30 kDa fue reducida con 50 µl de 10 mM de ditiotreitól (DTT) en 100 mM de bicarbonato de amonio pH 8,0 durante 30 minutos. Tras la reducción, la pieza de gel fue alquilada con 50 µl de 55 mM de yodoacetamida en 100 mM de bicarbonato de amonio pH 8,0 durante 20 minutos. Se permitió a la pieza de gel seco crecer en 25 µl de una solución de digestión de tripsina que contenía 6 ng por µl de tripsina de calidad de secuenciación (Promega, Madison, WI, USA) de 50 mM de bicarbonato de amonio pH 8 durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una digestión de 8 horas a 40°C. Cada uno de los pasos de reacción anteriormente descritos fue seguido de

5 numerosos lavados y prelavados con las soluciones apropiadas siguiendo el protocolo de estándar del fabricante. Se usaron cincuenta µl de acetonitrilo para deshidratar la pieza de gel entre reacciones y la pieza de gel fue secada al aire entre cada paso. Los péptidos se extrajeron dos veces con un 1% de ácido fórmico/2% de acetonitrilo en agua de grado HPLC durante 30 minutos. Las soluciones de extracción de péptidos fueron transferidas a una placa con faldón de tipo PCR con 96 pocillos (ABGene, Rochester NY, USA) que había sido enfriada hasta 10-15°C y cubiertas con una tapa de placa de 96 pocillos (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) para prevenir la evaporación. Las placas fueron además almacenadas a 4°C hasta que se pudo realizar el análisis de espectrometría de masas.

10 [0230] Identificación de proteínas. Para secuenciación *de novo* de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem, se usó un Q-TOF MICRO™ (Water Micromass MS Technologies, Milford, MA, USA), un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar ortogonal híbrido, fue usado para análisis LC/MS/MS. El Q-TOF MICRO™ está completamente controlado por microprocesador usando software de MASSLYNX™ versión 4.1 (Water Micromass MS Technologies, Milford, MA, USA). El Q-TOF MICRO™ estaba equipado con un sistema HPLC capilar y de nano-flujo ULTIMATE™, que fue acoplado a un micro automuestreador FAMOS™ y a un dispositivo conmutador de columnas SWITCHOS™ II (LCPackings/Dionex, Sunnyvale, CA, USA) para concentrar y desalar muestras. Las muestras fueron cargadas sobre una columna de guarda (300 µm ID X 5 cm, PEPMAP™ C18) ajustada en el bucle de inyección y lavadas con un 0,1% de ácido fórmico en agua a 40 µl por minuto durante 2 minutos utilizando una bomba Switchos II. Los péptidos fueron separados en una columna capilar fundida de nanoflujo PEPMAP™ (LC Packings, San Francisco, CA, USA) de 75 µm ID x 15 cm, C18, 3 µm, 100Å a una tasa de flujo de 175 nl/minuto de un flujo dividido de 175 µl/minuto utilizando un calibrador NAN-75 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Se aplicó un gradiente de elución escalonado del 5% al 80% de acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico sobre un intervalo de 45 minutos. El eluyente de columna fue monitorizado a 215 nm e introducido en el Q-TOF MICRO™ a través de una fuente de iones de electrospray equipada con la interfaz de nanopulverización.

25 [0231] Los datos fueron adquiridos en modo de exploración en un rango de masas de 400 a 1990 m/z con criterio de conmutación de MS a MS/MS para incluir una intensidad iónica mayor de 10,0 cuentas por segundo y estados de carga de +2; +3 y +4. Se pudieron obtener espectros de análisis de hasta 4 especies en coelución con un tiempo de exploración de 1,9 segundos y tiempo de interexploración de 0,1 segundos. Se usó típicamente un voltaje de cono de 45 voltios y la energía de colisión fue programada para ser variada según la masa y el estado de carga del péptido en elución y en el rango de 10 a 60 voltios. Los espectros adquiridos fueron combinados, homogeneizados y centrados de forma automatizada y se generó una lista de valores máximos. La lista de valores máximos fue buscada contra bases de datos seleccionadas usando el software de PROTEINLYNX™ Global Server 2.2.05 (Water Micromass MS Technologies, Milford, MA, USA) y PEAKS Studio versión 4.5 (SP1) (Bioinformatic Solutions Inc., Waterloo, Ontario, Canadá). Los resultados de las búsquedas de PROTEINLYNX™ y PEAKS Studio fueron evaluados y las proteínas no identificadas fueron adicionalmente analizadas evaluando los espectros MS/MS de cada ión de interés y la secuencia de novo fue determinada identificando las series iónicas y y b, y emparejando las diferencias de masa con el aminoácido apropiado.

40 [0232] Se obtuvo una secuencia de péptidos de un ión peptídico múltiplemente cargado recuperado de la banda de gel polipeptídica de 30 kDa digerida en gel. Se determinó que un ión peptídico tríptico doblemente cargado de la secuencia 514,772 m/z era Asn-Ser-Tyr-Pro-Gly-Tyr-[Asp o Asn]-Gly-Arg (SEQ ID n°: 4).

45 Ejemplo 2: Extracción de ADN genómico de *Humicola insolens* DSM 1800

50 [0233] Se creció *Humicola insolens* DSM 1800 en placas PDA a 45°C hasta confluencia. Tres cuadrados de 4 mm² fueron recortados de las placas PDA, inoculados en 25 ml de medio YP que contenía un 2% de glucosa en un matraz de agitación bafleado de 125 ml e incubados a 41°C con agitación a 200 r.p.m. durante 2 días. Los micelios fueron cosechados por filtración usando MIRACLOTH® (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), lavados dos veces en agua desionizada y congelados en nitrógeno líquido. Los micelios congelados fueron molidos mediante mortero hasta un polvo fino y el ADN total fue aislado utilizando un DNEASY® Plant Maxi Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

Ejemplo 3: Aislamiento de un fragmento parcial de un gen de acetilxilano esterasa de *Humicola Insolens* DSM 1800

55 [0234] Usando el Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer Program (CODEHOP; Rose et al., 1998, Nucleic Acids Research 26: 1628-1635), los cebadores degenerados, mostrados a continuación, fueron diseñados para el péptido identificado descrito en el ejemplo 1.
Cebador HiFAE-degF

60 5'-WSNYTNCARCARGTNTGGAAAYTGGGGNGCNAAY-3' (SEQ ID n°: 5)
Traducción de proteína para el cebador degenerado HiFAE-degF:

XXQQVWNWGA (SEQ ID n°: 6)

65 Cebador HiFAE-degR:

5'-GGCGGCGGCCGTCRTANCCNGGRTA-3' (SEQ ID nº: 7)

Traducción de proteína para el cebador degenerado HiFAE-degR:

5 YPGYDGRR

[0235] Para obtener el fragmento de ADN inicial del gen de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens*, la reacción de amplificación (25 µl) estuvo compuesta por 117 ng de ADN genómico de *Humicola insolens* DSM 1800 como plantilla, 0,4 mM cada una de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 50 pmol cada uno de cebador HiFAE-degR y cebador HiFAE-degF, tampón 1X ADVANTAGE® GC-Melt LA (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) y 1,25 unidades de una mezcla de polimerasa genómica ADVANTAGE® GC. La amplificación fue realizada utilizando un MASTERCYCLER® 5333 de EPPENDORF® (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY USA) programado para pre-desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; 30 ciclos cada uno a una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos; una temperatura de alineamiento de 60°C durante 30 segundos; elongación a 72°C durante 90 segundos; y elongación final a 72°C durante 5 minutos.

[0236] Los productos de reacción fueron aislados mediante electroforesis en gel de agarosa del 1,0% en tampón TBE (10,8 g de Tris base, 5,5 g de ácido bórico y 4 ml de 0,5 M de EDTA pH 8,0 por litro). Una banda de producto de PCR de aproximadamente 1,1 kb fue cortada del gel, purificada utilizando un QIAQUICK® Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) según las instrucciones del fabricante y secuenciada. Basándose en la secuenciación se ha observado que el cebador HiFAE-degF no se enlazó durante la amplificación, mientras que el cebador HiFAE-degR se enlazó a ambos extremos. Se obtuvo una secuencia parcial que codificaba un fragmento peptídico que era homólogo a una acetilxilano esterasa putativa de *Neosartoria fischeri* (Uniprot: A1 DBP9).

25 Ejemplo 4: identificación de un gen completo de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens*

[0237] Se identificó un gen completo de acetilxilano esterasa de la familia CE1 a partir de *Humicola insolens* DSM 1800 usando un GENOMEWALKER™ Universal Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. En resumen, el ADN genómico total de *Humicola insolens* DSM 1800 fue digerido por separado con cuatro enzimas de restricción diferentes (Dra I, Eco RV, Pvu II y Stu I) que dejan extremos romos. Cada lote de ADN genómico digerido fue luego ligado separadamente al GENOMEWALKER™ Adaptor (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) para crear cuatro bibliotecas. Estas cuatro bibliotecas fueron luego empleadas como plantillas en reacciones PCR usando dos cebadores específicos de gen mostrados a continuación, uno para una PCR primaria y uno para una amplificación de PCR secundaria amplificando el descenso del fragmento a través del extremo 3' y codificando el C-terminal de la acetilxilano esterasa. Basándose en la homología de secuencias con otras acetilxilano esterasas, pareció que el extremo 5' que codifica el N-terminal de la acetilxilano esterasa estaba contenido en el fragmento inicial descrito en el ejemplo 3. Los siguientes cebadores fueron diseñados basándose en la secuencia de genes de acetilxilano esterasa parcial de *Humicola insolens* obtenida como se describe en el ejemplo 3:

40 Cebador Hins AXE GSP1 F1 (primario):

5'-CTACACGGGCACTGTTGCTGGCTGGAA-3' (SEQ ID nº: 8)

45 Cebador Hins AXE GSP2 F3 (secundario):

5'-ACACTGGGCCAGGACGGCGCTCGATAT-3' (SEQ ID nº: 9)

[0238] Las amplificaciones primarias estuvieron compuestas de 1 µl (aproximadamente 6 ng) de cada biblioteca como plantilla, 0,4 mM cada una de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 10 pmol de cebador adaptador 1 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), 50 pmol de cebador Hins AXE GSP1 F1, tampón 1X ADVANTAGE® GC-Melt LA (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) y 1,25 unidades de una mezcla de polimerasa genómica ADVANTAGE® GC en un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones fueron realizadas utilizando un MASTERCYCLER® 5333 de EPPENDORF® programado para pre-desnaturalización a 95°C durante 1 minuto; 5 ciclos cada uno a una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 25 segundos; alineación y elongación a 72°C durante 5 minutos; 7 ciclos cada uno a una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 25 segundos; alineación y elongamiento a 72°C durante 5 minutos; 32 ciclos cada uno a una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 25 segundos; alineación y elongación a 67°C durante 5 minutos; y una elongación final a 67°C durante 7 minutos.

[0239] Las amplificaciones secundarias estuvieron compuestas de 1 µl de cada producto de PCR primario como plantilla, 0,4 mM cada una de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 10 pmol de cebador adaptador 2 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA), 50 pmol de cebador Hins AXE GSP2 F3, tampón 1X ADVANTAGE® GC-Melt LA y 1,25 unidades de una mezcla de polimerasa genómica ADVANTAGE® GC en un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones fueron realizadas utilizando un MASTERCYCLER® 5333 de EPPENDORF® programado para pre-desnaturalización a 95°C durante 1 minuto; 5 ciclos cada uno a una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 25 segundos; alineación y elongación a 72°C durante 5 minutos; 20 ciclos cada uno a una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 25 segundos; alineación y elongación a 67°C durante 5 minutos; y elongación final a 67°C durante 7 minutos.

[0240] Los productos reactivos fueron aislados mediante electroforesis en gel de agarosa del 1,0% en tampón TBE. De la biblioteca Pvu II, productos de 1 kb y 1,8 kb fueron cortados del gel, purificados utilizando un QIAQUICK® Gel Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) según las instrucciones del fabricante y secuenciados.

[0241] La secuenciación del ADN de los fragmentos de PCR fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado modelo 377 XL de Perkin-Elmer Applied Biosystems usando química de terminador de coloración (Giesecke et al., 1992, supra) y la estrategia del paseo de cebador. El cebador adaptador 2 y el cebador Hins AXE GSP2 F3 se usaron para la secuenciación.

[0242] Los datos de secuencia de nucleótidos fueron estudiados con detalle para mayor calidad y todas las secuencias fueron comparadas entre sí con ayuda del software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA). Los resultados de la secuencia del fragmento de PCR fueron comparados y alineados con la secuencia parcial de genes de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* descrita en el ejemplo 3. Se construyó un modelo de gen basado en los fragmentos de gen obtenidos en este ejemplo y en el ejemplo 3 permitiendo la determinación de los extremos 5' y 3' del gen con otras acetilxilano esterasas homólogas.

Ejemplo 5: clonación del gen de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* y construcción de un vector de expresión de *Aspergillus niger*

[0243] Dos cebadores sintéticos de oligonucleótidos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificación por PCR del gen de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* del ADN genómico preparado en el ejemplo 2. Un InFusion Cloning Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pBM120a (WO 2006/078256).

HinsAXEBDinfnterm:

5'-ACACAACCTGGCCATGAAGGTCCCGACTCTCATCTCG-3' (SEQ ID nº: 10)

HinsAXEBDinfCtermendPacl:

5'-CAGTCACCTCTAGTTATTACAGGCACTGAGAGTACC-3' (SEQ ID nº: 11)

Las letras en negrita representan la secuencia codificante. La secuencia restante es homóloga a los sitios de inserción de pBM120a.

[0244] Se usaron cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores en una reacción PCR compuesta por 80 ng de ADN genómico de *Humicola insolens*, tampón 1X ADVANTAGE® GC-Melt LA, 0,4 mM cada una de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, y 1,25 unidades de una mezcla de polimerasa genómica ADVANTAGE® GC en un volumen final de 25 µl. La amplificación fue realizada utilizando un MASTERCYCLER® 5333 de EPPENDORF® programado para 1 ciclo a 94°C durante 1 minuto; 30 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos; y una elongación final a 70°C durante 5 minutos. El bloque calentador pasó entonces a un ciclo de remojo a 4°C.

[0245] Los productos reactivos fueron aislados mediante electroforesis en gel de agarosa del 1,0% en tampón TBE donde una banda de producto de aproximadamente 1,2 kb a 1,3 kb fue cortada del gel y purificada utilizando un QIAQUICK® Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

[0246] El plásmido pBM120a fue digerido con Nco I y Pac I, aislado mediante electroforesis en gel de agarosa del 1,0% en tampón TBE y purificado utilizando un QIAQUICK® Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

[0247] El fragmento de gen y el vector digerido fueron ligados utilizando un InFusion Cloning Kit dando como resultado pMMar6 (figura 2) en el cual, la transcripción del gen de acetilxilano esterasa estaba bajo el control de un híbrido de promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae* (promotor NA2-tpi). La reacción de ligación (20 µl) estuvo compuesta por tampón 1X InFusion (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA), 1X BSA (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA), 1 µl de enzima InFusion (diluida 1:10) (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA), 106 ng de pBM120a digerido con Nco I y Pac I, y 208 ng del producto de PCR de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* purificado. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Dos µl de la reacción se usaron para transformar células supercompetentes SOLOPACK® Gold XL10 (Stratagene, la Jolla, CA, USA) de *E. coli* según las instrucciones del fabricante. Un transformante de *E. coli* que contiene pMMar6 fue detectado por digestión de restricción y se preparó ADN de plásmido utilizando un BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). La inserción del gen de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* en pMMar6 fue confirmada mediante secuenciación de ADN con un secuenciador de ADN automatizado de Perkin-Elmer Applied Biosystems usando química de terminador de coloración (Giesecke et al., 1992, supra) y la estrategia del paseo de cebador. El cebador 996271 promotor Na2tpi fwd y el cebador 996270 AMG rev, mostrados a continuación, fueron usados para secuenciación. 996271 promotor Na2tpi fwd:

5'-ACTCAATTTACCTCTATCCACACTT-3' (SEQ. ID N°: 12)

996270 AMG rev:

5

5'-CTATAGCGAAATGGATTGATTGTCT-3' (SEQ. ID N°: 13)

10

[0248] Un clon que contenía pMMar6 fue escogido en 2 X 50 ml de medio LB que contenía 100 µg de ampicilina por ml y crecido durante toda la noche en matraces de vidrio de 250 ml a 37°C y agitación a 200 r.p.m. El plásmido pMMar6 fue aislado del caldo usando un QIAGEN® Midi Kit según las instrucciones del fabricante. El plásmido pMMar6 fue digerido con Pme I, aislado mediante electroforesis en gel de agarosa del 1,0% en tampón TBE y el fragmento que contenía el gen de acetilxilano esterasa fue purificado utilizando un QIAQUICK® Extraction Kit según las instrucciones del fabricante, como preparación para transformar protoplastos de *Aspergillus niger* MBin120. El mismo fragmento de PCR de 1,2 a 1,3 kb aproximadamente fue clonado en el vector de PCR®2.1-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando un TOPO® TA CLONING KIT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para generar pHinsAXE2 (figura 3). La inserción del gen de acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* en pHinsAXE2 fue confirmada mediante secuenciación de ADN. El pHinsAXE2 de *E. coli* se depositó en la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, Peoria, IL, USA, el 20 de noviembre de 2007.

15

20

Ejemplo 6: caracterización de la secuencia genómica de *Humicola insolens* que codifica una acetilxilano esterasa de la familia CE1

25

[0249] Los datos de la secuencia de nucleótidos (ejemplo 5) fueron estudiados con detalle para mayor calidad y todas las secuencias fueron comparadas entre sí con asistencia del software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).

30

[0250] La secuencia de nucleótidos (SEQ ID n°: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID n°: 2) se muestran en las figuras 1A y 1B. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 377 aminoácidos, interrumpido por 2 intrones predichos de 73 pares de bases y 62 pares de bases. El contenido G+C en porcentaje de la secuencia codificante completa y la secuencia codificante madura es del 60,4% y 60,5%, respectivamente. Usando el programa de software Signal (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 19 residuos. La proteína madura predicha contiene 358 aminoácidos con una masa molecular de 38,5 kDa. Un dominio de esterasa polihidroxibutirato despolimerasa predicho aparece en los aminoácidos 43 a 257 y un dominio de unión de celulosa predicho en los aminoácidos 341 a 377. Basándose en la secuencia de aminoácidos deducida, la acetilxilano esterasa parece que encaja dentro de la familia CE1 de carbohidrato esterases según Coutinho y Henrissat, 1999, supra.

35

40

[0251] Se determinó un alineamiento global en parejas comparativo de secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo de Needleman- Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle de EMBOSS con penalización de apertura de gap de 10, penalización de extensión de gap de 0,5 y matriz EBLOSUM62. La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido maduro del gen de acetilxilano esterasa de la familia CE1 de *Humicola insolens* compartía un 72,4% de identidad (excluyendo gaps) con la secuencia de aminoácidos deducida de una acetilxilano esterasa de *Chaetomium gracile* (GeneSeqP número de acceso AAB82124).

45

Ejemplo 7: transformación y expresión del gen de acetilxilano esterasa de la familia CE1 de *Humicola insolens* en *Aspergillus niger* MBin120

50

[0252] El gen de acetilxilano esterasa de la familia CE1 de *Humicola insolens* fue expresado en *Aspergillus niger* MBin120. Se prepararon los protoplastos de *Aspergillus niger* MBin120 según el método de Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Se usaron cinco µg de pMMar6 digerido con Pme I para transformar *Aspergillus niger* MBin120.

55

[0253] La transformación de *Aspergillus niger* MBin120 con pMMar6 digerido con Pme I produjo aproximadamente 45 transformantes. Veinticinco transformantes fueron aislados en placas individuales urea- acetamida+ COVE A. Dos tapones de agar cuadrados de 3mm fueron recortados de las placas urea- acetamida+ COVE A confluyentes de los 25 transformantes e inoculados separadamente en 25 ml de medio M410 en matraces de agitación de plástico de 125 ml e incubados a 34°C con agitación a 250 r.p.m. Después de 5 días de incubación, 6 µl de sobrenadante de cada cultivo fueron analizados en un gel CRITERION™ de Tris-HCl SDS-PAGE 8-16% con un CRITERION® Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), según las instrucciones del fabricante. El gel resultante fue teñido con colorante de coomassie de BIO-SAFE™.

60

65

[0254] Los perfiles SDS-PAGE de los cultivos mostraron que aproximadamente la mitad de los transformantes tenían una banda principal de aproximadamente 50 kDa. Un transformante designado *Aspergillus niger* MMar204 fue elegido para la expresión del polipéptido de *Humicola insolens* con actividad de acetilxilano esterasa en *Aspergillus niger*.

Ejemplo 8: fermentación de *Aspergillus niger* MMar204

[0255] El medio del matraz de agitación estaba compuesto de 70 g de sacarosa y 100 g de concentrado de soja por litro. La solución de oligoelementos estaba compuesta de 13,8 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14,3 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,6 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3,3 g de ácido cítrico monohidrato por litro.

[0256] Se añadieron cien ml del medio del matraz de agitación a cada uno de los cuatro matraces de agitación de 500 ml. Los matraces de agitación fueron cada uno inoculados con 200 μl de un suministro de esporas en glicerol de *Aspergillus niger* MMar204 e incubado a 30°C en un agitador orbital a 220 r.p.m. durante 72 horas. Cincuenta ml del caldo del matraz de agitación de cada uno de los cuatro matraces de agitación fueron usados para inocular un recipiente de fermentación de 3 litros.

[0257] El medio del lote de fermentación estaba compuesto de 250 g de glucosa, 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de K_2SO_4 , 1 g de ácido cítrico, 1 ml de anti-espuma y 0,75 ml de solución de oligoelementos por litro. La solución de oligoelementos estaba compuesta de 13,8 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14,3 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,6 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 3,3 g de ácido cítrico monohidrato por litro. El medio de fermentación del pienso estaba compuesto de 406 g de maltosa, 0,5 g de ácido cítrico monohidrato y 1 ml de anti-espuma por kilogramo.

[0258] Un total de 2 litros del medio de lote de fermentación se añadieron a un fermentador de vidrio de dos litros con chaqueta de Applikon Biotechnology (Applikon Biotechnology, Schiedam, Países Bajos). El medio de fermentación del pienso fue dosificado a razón de 0 a 4 g/l/h durante un periodo de 185 horas. El recipiente de fermentación fue mantenido a una temperatura de 34°C y el pH fue controlado usando un sistema de control Applikon 1030 (Applikon Biotechnology, Schiedam, Países Bajos) con un punto de ajuste de $5,1 \pm 0,1$. Se añadió aire al recipiente a razón de 1 vvm y el caldo fue agitado por una turbina Rushton girando a 1100 r.p.m. Al final de la fermentación, todo el caldo fue extraído del recipiente y centrifugado a 3000 x g para eliminar la biomasa. El sobrenadante fue filtrado de modo estéril y almacenado a una temperatura de entre 5 a 10°C.

Ejemplo 9: purificación del polipéptido de *Humicola insolens* con actividad de acetilxilano esterasa

[0259] El sobrenadante del caldo de fermentación descrito en el ejemplo 8 fue primero cambiado de tampón en 20 mM de MES pH 6 y concentrado utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial Pall Filtron consistente en una Ultrapump II, un ULTRARESERVOIR™ 5L y una membrana de filtración de flujo tangencial ULTRASETTE™ 10K Omega con un límite de peso molecular de 10.000 Da (Pall Corporation, East Hills, NY, USA). El material resultante cambiado de amortiguador (150 ml) fue luego purificado sobre 120 ml de resina de perlas grandes SP SEPHAROSE™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrado con 20 mM de MES pH 6 y luego eluido con un gradiente lineal de 0-1 M de cloruro sódico. Las fracciones fueron recogidas y monitorizadas a 280 nm. Una alícuota de 2,5 μl de las fracciones que tienen absorbancia UV a 280 nm fue analizada en un gel CRITERION™ de Tris-HCl SDS-PAGE 8-16% según las condiciones sugeridas por el fabricante. Se usaron los estándares de PRECISION PLUS PROTEIN™ como marcadores de peso molecular. El gel fue teñido con coomassie de BIO-SAFE™. Las fracciones que mostraban una banda a 55 kDa, correspondiente a la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens*, fueron combinadas para producir acetilxilano esterasa purificada (130 ml) de pureza mayor del 90%.

[0260] La acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* fue ensayada para actividad enzimática usando p-nitrofenilacetato como sustrato (Sigma-Aldrich Chemical co., Inc., St Louis, MO, USA). Se realizaron ensayos de actividad en una placa de microtitulación de 96 pocillos de COSTAR® (Corning Inc., Corning, NY, USA). Una solución de 100 mM de p-nitrofenilacetato fue inicialmente preparada en DMSO y luego diluida en una solución 1 mM en 50 mM de acetato sódico pH 5,0 con un 0,01% de TWEEN® 20. La reacción enzimática fue luego iniciada añadiendo una alícuota de la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* purificada a la suspensión de 1 mM de p-nitrofenilacetato, dando como resultado una concentración de sustrato final de 0,5 mM de p-nitrofenilacetato. Se permitió a la reacción continuar durante 10 minutos a temperatura ambiente (25°C), tras los cuales se añadió Tris-HCl 1 M pH 8,0 y la cantidad de anión p-nitrofenolato liberado fue determinada por un aumento en la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de placas SPECTRAMAX™ 340 PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La concentración de proteína del purificado fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Una unidad de actividad de acetilxilano esterasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de anión p-nitrofenolato por minuto a pH 5 y 25°C.

[0261] Se determinó que la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* tenía una actividad de 15,4 unidades por mg de enzima.

Ejemplo 10: termoestabilidad de la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens*

[0262] La termoestabilidad de la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* purificada (ejemplo 9) fue determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un VP-DSC (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA) según las instrucciones del fabricante, en 50 mM de acetato sódico pH 5,0.

[0263] La temperatura de desnaturalización térmica, T_d , fue tomada como el máximo del pico de desnaturalización (pico endotérmico principal) en un termograma (C_p vs. T) obtenido después del calentamiento de la solución enzimática a una

tasa de calentamiento programada de 90°C por hora, empezando a 20°C. La T_d para la acetilxilano esterasa bajo estas condiciones fue de 71 (± 1) °C.

Ejemplo 11: efecto de la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* en la hidrólisis de fibra de maíz pretratado

[0264] Se evaluó el efecto de la acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* en la hidrólisis de fibra de maíz pretratado. La fibra de maíz es una fracción de la molienda húmeda de granos de maíz. La fibra de maíz es el recubrimiento y el endospermo residual de la semilla que queda después de que el almidón sea retirado y adicionalmente procesado. La fibra de maíz fue pretratada mediante autoclave a 140°C durante 150 minutos. Se determinó que la cantidad de arabinosa, glucosa y xilosa en el sustrato era de 175, 317 y 261 g por kg sustancia seca utilizando los siguientes métodos.

[0265] La arabinosa y la xilosa se determinaron mediante hidrólisis de carbohidratos usando ácido clorhídrico diluido. La fibra de maíz pretratada fue transferida a matraces cónicos de 125 ml y diluida para contener aproximadamente un 10% de sustancia seca. La muestra de fibra de maíz fue precalentada a 100°C en un baño de aceite. La hidrólisis fue empezada añadiendo 5 ml de 2 M de ácido clorhídrico durante 2 horas a 100°C. Después de la incubación, los matraces fueron enfriados en hielo y neutralizados con 4 M de hidróxido sódico. Las muestras fueron filtradas con un filtro de jeringa de 0,2 micras MINIMART® (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) y analizadas para arabinosa y xilosa en un sistema DIONEX BIOLC® (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). La glucosa fue determinada sometiendo la muestra pretratada de fibra de maíz a una hidrólisis con ácido sulfúrico de dos pasos. Tres ml de ácido sulfúrico del 72% se añadieron a aproximadamente 300 mg de fibra de maíz seco en tubos de presión (Ace Glass, Inc., Vineland, NJ, USA). Las muestras fueron mezcladas y puestas al baño maría a 30°C durante 60 minutos. Las muestras fueron agitadas cada 5 ó 10 minutos. Después de 60 minutos las muestras fueron retiradas y se añadieron 84 ml de agua desionizada. Las muestras fueron colocadas en una autoclave y calentadas durante 1 hora a 121°C. Tras el enfriamiento las muestras fueron filtradas para eliminar los sólidos restantes y neutralizadas mediante adición de carbonato cálcico.

[0266] La concentración de glucosa fue determinada con un sistema DIONEX® BIOLC® según el siguiente método. Las muestras (10 μ l) fueron cargadas sobre un sistema DIONEX BIOLC® equipado con una columna analítica (4 x 250 mm) CARBOPAC™ PA1 de DIONEX® (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) combinado con una columna de guarda (4 x 50 mm) CARBOPAC™ PA1 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Los monosacáridos fueron separados isocráticamente con 10 mM de hidróxido de potasio a una tasa de flujo de 1 ml por minuto y detectados mediante un detector electroquímico pulsado en modo de detección amperométrica pulsada. El potencial del electrodo fue programado a +0,1 voltios ($t=0$ a 0,4 segundos) a -2,0 voltios ($t=0,41$ a 0,42 segundos) a 0,6 voltios ($t=0,43$ segundos) y finalmente a -0,1 voltios ($t=0,44$ a 0,50 segundos), mientras se integraba la señal resultante de $t=0,2$ a 0,4 segundos. Una mezcla de arabinosa, galactosa, glucosa y xilosa (concentración de cada uno de los componentes: 0,0050 a 0,075 g por litro) fue usada como estándar.

[0267] La hidrólisis de la fibra de maíz pretratado fue llevada a cabo con una composición de proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* (un caldo de *Trichoderma reesei* que comprendía el polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* con actividad de potenciación celulolítica y fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*; PCT/US2008/065417) y una beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*. La beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* se obtuvo de manera recombinante mediante expresión en *Aspergillus oryzae* como se describe en Rasmussen et al., 2006, *Biotechnology and Bioengineering* 94: 869-876 usando métodos de cultivo estándar para *Aspergillus oryzae*. La acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* se obtuvo como se describe en el ejemplo 9.

[0268] La hidrólisis de la fibra de maíz pretratada se realizó en tubos de 2 ml de EPPENDORF® (Eppendorf AG, Alemania) a una temperatura de 50°C y un pH de 5,0 en 50 mM ácido succínico. Las muestras fueron incubadas en un THERMOMIXER® Comfort (AG de Eppendorf, Alemania) que sometió cada muestra a calentamiento y mezclado constantes. La cantidad de sustrato usada fue 2,5 p/p % en un volumen de muestra total de 2 ml. La acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* fue añadida con una carga enzimática de 1 mg de enzima por g de sustancia seca además de la composición de proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* y la beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*. La composición de proteína celulolítica de *Trichoderma reesei* fue añadida a una carga de 5 mg de enzima por g de sustancia seca y la beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* a una carga de 1 mg de enzima por g de sustancia seca. La hidrólisis fue terminada después de 24 horas, calentando las muestras durante 10 minutos a 100°C en un bloque calentador (Techne Inc., Burlington NJ, USA).

[0269] Se realizó la cuantificación de ácido acético por cromatografía en fase líquida de alta presión usando dos columnas AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) acopladas en serie con una pre-columna (Micro-Guard Cation H Refill Cartridges, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) con una bomba WATERS® 515, miliporo WATERS® MP5A, automuestreador WATERS® 717 Plus, módulo calentador de columna de WATERS® y detector WATERS® 2410 RI (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La cromatografía fue realizada a 60°C con un flujo de 0,4 ml/minuto de 0,005 M de ácido sulfúrico.

[0270] La conversión fue calculada determinando la cantidad de azúcares liberada del sustrato como un porcentaje de lo que fue añadido desde el principio utilizando la fórmula siguiente. Se realizaron pruebas-t con una distribución de dos

colas e igual varianza de datos de muestra.

Conversión (%) = (Cantidad de Azúcar en el Hidrolisato/Cantidad de Azúcar en el Sustrato Añadido) x 100

5 [0271] Comparando la conversión de fibra de maíz pretratado cuando se añade acetilxilano esterasa de Humicola insolens, teniendo una carga enzimática de 1 mg de enzima por sustancia seca de gramo, junto con 1 mg de enzima por g de sustancia seca de beta-xilosidasa de Trichoderma reesei y 5 mg de enzima por g de sustancia seca de composición de proteína celulolítica de Trichoderma reesei, respecto a cuando se añade sólo 1 mg de enzima por g de sustancia seca de beta-xilosidasa de Trichoderma reesei y 5 mg de enzima por g de sustancia seca de composición de proteína celulolítica de Trichoderma reesei, se demostró un aumento significativo ($P \leq 0,0519$) en la conversión relativa de 100,0 a 109,9 (tabla 1).

Tabla 1

Muestras	Conversión Total Relativa	Desviación Estándar	Prueba - T
Beta-xilosidasa de Trichoderma reesei y Composición de proteína celulolítica de Trichoderma reesei	100,0	3,2	0,0519
Beta-xilosidasa de Trichoderma reesei, acetilxilano esterasa de Humicola insolens y Composición de proteína celulolítica de Trichoderma reesei	109,9	3,4	

15

[0272] La liberación de ácido acético del sustrato aumentó significativamente ($P \leq 0,0004$) de 100,0 a 236,0 añadiendo la acetilxilano esterasa de Humicola insolens a una combinación de beta-xilosidasa de Trichoderma reesei y la composición de proteína celulolítica de Trichoderma reesei (tabla 2).

20

Tabla 2

Muestras	Conversión Total Relativa	Desviación Estándar	Prueba - T
Beta-xilosidasa de Trichoderma reesei y Composición de proteína celulolítica de Trichoderma reesei	100,0	10,0	0,0004
Beta-xilosidasa de Trichoderma reesei, acetilxilano esterasa de Humicola insolens y Composición de proteína celulolítica de Trichoderma reesei	236,0	2,8	

25

Ejemplo 12: efecto de la acetilxilano esterasa de Humicola insolens en la hidrólisis de tetraacetato de D-xilosa

[0273] Se evaluó el efecto de la acetilxilano esterasa de Humicola insolens en la hidrólisis de tetraacetato de D-xilosa. La acetilxilano esterasa de Humicola insolens se obtuvo como se describe en el ejemplo 9.

30

[0274] La hidrólisis de tetraacetato de D-xilosa (Benn Chemicals, Dielsdorf, Suiza) fue realizada en tubos de 1,5 ml de EPPENDORF® a una temperatura de 50°C y un pH de 5,0 en 50 mM de ácido succínico durante 48 horas. Las muestras fueron incubadas en una THERMOMIXER® Comfort que sometió cada muestra a calentamiento y mezclado constantes. La cantidad de sustrato usada fue 1 ml con una concentración de 1 p/p % de tetraacetato de D-xilosa. La muestra de control (1 ml de sustrato) fue comparada con la muestra de acetilxilano esterasa de Humicola insolens (1 ml de sustrato + 7 µl de enzima). La acetilxilano esterasa de Humicola insolens fue añadida con una carga enzimática de 0,5 mg de acetilxilano esterasa de Humicola insolens /g de sólidos secos. La hidrólisis fue terminada después de 48 horas, calentando las muestras durante 10 minutos a 100°C en un bloque calentador.

35

40

[0275] La cantidad de acetato fue analizada por HPLC como se describe en el ejemplo 11. La adición de 0,5 mg de acetilxilano esterasa de Humicola insolens a 1 ml de sustrato (1 p/p % de tetraacetato de D-xilosa) resultó en una liberación calculada de 89,2 µmol/ml acetato (tabla 3). La liberación de acetato por parte de la acetilxilano esterasa de Humicola insolens fue calculada a partir de las concentraciones de la muestra de control (1,9 µmol/ml) y la muestra de acetilxilano esterasa de Humicola insolens (91,1 µmol/ml).

Tabla 3

Muestras	Concentración de acetato ($\mu\text{mol/ml}$)	Acetato liberado por la Enzima ($\mu\text{mol/ml}$)
Control	1,9	
Acetilxilano esterasa de <i>Humicola insolens</i>	91,1	89,2

Depósito de Material biológico

5

[0276] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, Peoria, IL, USA y asignado el siguiente número de acceso: Fecha del Número de Acceso al Depósito de E. coli pHinsAXE2 NRRL B-50076, 20 de noviembre de 2007

10

[0277] 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 aquel autorizado a ello por leyes de patente extranjeras. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según sea requerido por leyes de patente extranjeras en países donde duplicados de la solicitud, o sus descendientes, son solicitados. No obstante, se debería entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patentes concedidos por acción gubernamental.

15

[0278] La presente invención es además descrita por los siguientes párrafos numerados:

20

1. [1] Un polipéptido aislado con actividad de acetilxilano esterasa, seleccionado del grupo que consiste en:

25

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos bajo condiciones de astringencia medias-altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1 o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii);

30

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1; y

(d) una variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

35

[2] El polipéptido del párrafo 1, que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[3] El polipéptido del párrafo 2, que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

40

[4] El polipéptido del párrafo 3, que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

45

[5] El polipéptido del párrafo 4, que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[6] El polipéptido del párrafo 5, que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 95% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

50

[7] El polipéptido del párrafo 6, que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 97% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[8] El polipéptido del párrafo 1, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 2; o un fragmento de la misma que tiene actividad de acetilxilano esterasa.

[9] El polipéptido del párrafo 8, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 2.

55

[10] El polipéptido del párrafo 8, que comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[11] El polipéptido del párrafo 1, que es codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos bajo condiciones de astringencia medias-altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii).

60

[12] El polipéptido del párrafo 11, que es codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos bajo condiciones de astringencia altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii).

[13] El polipéptido del párrafo 1, que es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.

65

[14] El polipéptido del párrafo 13, que es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1.

[15] El polipéptido del párrafo 14, que es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.

- [16] El polipéptido del párrafo 15, que es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.
- [17] El polipéptido del párrafo 16, que es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.
- 5 [18] El polipéptido del párrafo 17, que es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.
- [19] El polipéptido del párrafo 1, que es codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n°: 1; o una subsecuencia de la misma que codifica un fragmento con actividad de acetilxilano esterasa.
- 10 [20] El polipéptido del párrafo 19, que es codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n°: 1.
- [21] El polipéptido del párrafo 19, que es codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.
- [22] El polipéptido del párrafo 1, donde el polipéptido es una variante que comprende una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.
- 15 [23] El polipéptido del párrafo 1, que es codificado por el polinucleótido contenido en plásmido pHinsAXE2 que está contenido en E. coli NRRL B-50076.
- [24] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 23, donde el polipéptido maduro consiste en los aminoácidos 20 a 377 de la SEQ ID n°: 2.
- 20 [25] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 24, donde la secuencia codificante del polipéptido maduro consiste en los nucleótidos 58 a 1266 de la SEQ ID n°: 1.
- [26] Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 25.
- 25 [27] El polinucleótido aislado del párrafo 26, que comprende al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, en la que la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.
- [28] Un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido de los párrafos 26 ó 27 operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 30 [29] Un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos del párrafo 28.
- [30] Una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos del párrafo 28.
- [31] Un método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 25, que comprende: (a) cultivar una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- 35 (b) recuperar el polipéptido.
- [32] Un método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 25, que comprende: (a) cultivar una célula huésped que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- [33] Un método para producir un mutante de una célula madre, que comprende interrumpir o delecionar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 25, lo que provoca que el mutante produzca menos polipéptido que la célula madre.
- 40 [34] Una célula mutante producida mediante el método del párrafo 33.
- [35] La célula mutante del párrafo 34, que comprende además un gen que codifica una proteína heteróloga o nativa.
- [36] Un método para producir una proteína, que comprende: (a) cultivar la célula mutante del párrafo 35 bajo condiciones propicias para la producción de la proteína; y (b) recuperar la proteína.
- 45 [37] El polinucleótido aislado de los párrafos 26 ó 27, obtenido (a) hibridando una población de ADN al menos bajo condiciones de astringencia medias-altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii); y (b) aislando el polinucleótido que se hibrida, el cual codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa.
- 50 [38] El polinucleótido aislado del párrafo 37, obtenido (a) hibridando una población de ADN al menos bajo condiciones de astringencia altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii); y (b) aislando el polinucleótido que se hibrida, el cual codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa.
- 55 [39] El polinucleótido aislado de los párrafos 37 ó 38, donde la secuencia codificante del polipéptido maduro consiste en los nucleótidos 58 a 1266 de la SEQ ID n°: 1.
- [40] Un método para producir un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos mutante que codifica un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa, que comprende: (a) introducir al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2; y (b) recuperar el polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mutante.
- 60 [41] Un polinucleótido mutante producido mediante el método del párrafo 40.
- [42] Un método para producir un polipéptido, que comprende: (a) cultivar una célula que comprende el polinucleótido mutante del párrafo 41 que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- 65

- [43] Un método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 25, que comprende: (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprenden un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- 5 [44] Una planta, parte de planta o célula vegetal transgénica transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1 a 25.
- [45] Una molécula de ARN bicatenario (ARNdc) inhibitorio que comprende una subsecuencia del polinucleótido de los párrafos 26 ó 27, donde opcionalmente el ARNdc es una molécula de ARNip o de miARN.
- [46] La molécula de ARN bicatenario (ARNdc) inhibitorio del párrafo 45, que es aproximadamente de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos dúplex de longitud.
- 10 [47] Un método para inhibir la expresión de un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa en una célula, que comprende administrar a la célula o expresar en la célula una molécula de ARN bicatenario (ARNdc), donde el ARNdc comprende una subsecuencia del polinucleótido de los párrafos 26 ó 27.
- [48] El método del párrafo 47, donde el ARNdc es aproximadamente de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos dúplex de longitud.
- 15 [49] Un constructo de ácidos nucleicos que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazado a una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID nº: 2, donde el gen es extranjero a la secuencia de nucleótidos.
- [50] Un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos del párrafo 49.
- 20 [51] Una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos del párrafo 49.
- [52] Un método para producir una proteína, que comprende: (a) cultivar la célula huésped recombinante del párrafo 51 bajo condiciones propicias para la producción de la proteína; y (b) recuperar la proteína.
- [53] Un método para degradar un material que contiene xilano, que comprende tratar el material que contiene xilano con el polipéptido que tiene actividad de acetilxilano esterasa de cualquiera de los párrafos 1 a 25.
- 25 [54] El método del párrafo 53, que comprende además tratar el material que contiene xilano con un enzima degradadora de xilano.
- [55] El método del párrafo 54, donde la enzima degradadora de xilano es seleccionada del grupo que consiste en una xilanasa, feruloil esterasa, arabinofuranosidasa, xilosidasa, glucuronidasa y una combinación de las mismas.
- [56] El método de cualquiera de los párrafos 53 a 55, donde el material con xilano es un pienso para animales.
- 30 [57] El método de cualquiera de los párrafos 53 a 55, donde el material con xilano es una pulpa kraft.
- [58] El método de cualquiera de los párrafos 53 a 55, donde el material con xilano es una biomasa celulósica o lignocelulósica.
- [0279] La invención descrita en este documento no debe ser limitada en su alcance por los aspectos específicos revelados en este documento, debido a que se pretende que estos aspectos sean ilustraciones de diferentes aspectos de la invención.
- 35 Se pretende que cualquier aspecto equivalente esté dentro del campo de esta invención.
- De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en este documento se harán aparentes a los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente.
- 40 El alcance de la patente solo está limitado por las reivindicaciones anexas.
- En caso de conflicto, la presente divulgación, incluyendo definiciones, prevalecerá.

LISTA DE SECUENCIAS

- 45 [0280]
- <110> Novozymes A/S
Maranta, Michelle
Brown, Kimberly
- 50 <120> Polypeptides having acetylxylan activity and polynucleotides encoding same
- <130> 11329.204-WO
- 55 <150> US 60/992,995
<151> 2007-12-06
<160> 11

ES 2 490 608 T3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1269

<212> DNA

<213> Humicola insolens

5

<400>		1				
atgaaggtcc	cgactctcat	ctcgagcctc	ctggctctgg	tctccttctc	cgaggccacg	60
cegetcatca	agcgagcgac	gtcacgcgg	gtcaacaact	tggtaacaa	ccctagcgg	120
gcgcgcatgt	acatctatgt	gcccgacagg	cttcagccac	gtcctgccgt	tctcacggcc	180
gttcaactact	gcacggggac	cgccaacgcc	ttctacaccg	gtactcogta	tgtctgtctt	240
gccgaccagt	atggcttcat	tgtcgtctac	cgggagtctc	ccaataacgg	cggttgctgg	300
gatgtctcgt	cccgcgctgc	ctacaccgcg	gatagcgggt	ccaacagcca	cgccatttct	360
ctcatgacga	agtgggctct	gcagcaatat	aatggtgacc	cagagaaggt	ctttgttgcc	420
ggcaccagct	cgggcgctat	gatgacggtg	agtgacacag	agatgaggct	caagttgtgg	480
tcagctacot	tgtcccgggt	actgacacct	gtctcaccag	aatgttctct	ctgctgtgta	540
ccctgatctg	tacaaggctg	ccgctgccta	cgttgggtgc	cctgcgggct	gcttctacac	600
gggcaactgtt	gctggctgga	actcgacttg	cgccaacggc	cagtcatta	ccactcagga	660
acactgggcc	aggacggcgc	tcgatatgta	ccctggctac	accggccccg	gtccacgcat	720
gctcatctac	cacggctccg	ctgacacgac	catctatcct	cgggtaagcc	ctatgcccc	780
caaaaagcag	gctattggac	ctccaataac	tgacaaccgc	cgcagaactt	caacgagact	840
ctgaagcagt	gggcccggct	tttcggttac	acttacggcc	agcctcagca	gaccctcccc	900
aacaccccgt	cggcgctta	caccaagtat	gtctacggcc	ccaacctcgt	cggcatctac	960
ggcagcggcg	tcaccacaaa	catccccgtc	aacggcgcca	acgacatgga	atggttcggc	1020
atcacgggca	acccgaccac	cacctcgacg	tctgctactg	tgccctactac	cacgagcagc	1080
cccggaacca	cctcagaccg	cgcctccggc	accacgacca	cctcccgggc	tcctccccct	1140
cctaccacga	cttgtatacc	ogttcctcgt	tggggccagt	gaggcggcat	cacctgggga	1200
ggctgcacgg	tgtgcgaggc	gccgtacact	tgccagaagc	tgaatgattg	gtactctcag	1260
tgccctgtaa						1269

10

<210> 2

<211> 377

<212> PRT

<213> Humicola insolens

<400>

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

Thr Thr Gln Glu His Trp Ala Arg Thr Ala Leu Asp Met Tyr Pro Gly
 195 200 205
 Tyr Thr Gly Pro Arg Pro Arg Met Leu Ile Tyr His Gly Ser Ala Asp
 210 215 220
 Thr Thr Ile Tyr Pro Arg Asn Phe Asn Glu Thr Leu Lys Gln Trp Ala
 225 230 235 240
 Gly Val Phe Gly Tyr Thr Tyr Gly Gln Pro Gln Gln Thr Leu Pro Asn
 245 250 255
 Thr Pro Ser Ala Pro Tyr Thr Lys Tyr Val Tyr Gly Pro Asn Leu Val
 260 265 270
 Gly Ile Tyr Gly Ser Gly Val Thr His Asn Ile Pro Val Asn Gly Ala
 275 280 285
 Asn Asp Met Glu Trp Phe Gly Ile Thr Gly Asn Pro Thr Thr Thr Ser
 290 295 300
 Thr Ser Ala Thr Val Pro Thr Thr Thr Ser Ser Pro Gly Thr Thr Ser
 305 310 315 320
 Thr Ser Ala Pro Val Thr Thr Thr Thr Ser Arg Ala Pro Pro Pro Pro
 325 330 335
 Thr Gln Thr Cys Ile Pro Val Pro Arg Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
 340 345 350
 Thr Trp Gly Gly Cys Thr Val Cys Glu Ala Pro Tyr Thr Cys Gln Lys
 355 360 365
 Leu Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 370 375

<210> 3

<211> 13

5

<212> PRT

<213> Humicola insolens

Ala Ser Leu Gln Gln Val Trp Asn Trp Gly Ala Asn Pro

<400> 3 1

5

10

10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Humicola insolens

Asn Ser Tyr Pro Gly Tyr Asx Gly Arg

<400> 4 1

5

5

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Humicola insolens

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> w = a or t

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> s = c or g

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n is a, c, g, or t

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> y = c or t

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n is a, c, g, or t

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> r = c or g

40

<220>

<221> misc_feature

ES 2 490 608 T3

```

<222> (12)..(12)
<223> r = c or g

<220>
5 <221> misc_feature
  <222> (15)..(15)
  <223> n is a, c, g, or t

<220>
10 <221> misc_feature
   <222> (21)..(21)
   <223> y = c or t

<220>
15 <221> misc_feature
   <222> (27)..(27)
   <223> n is a, c, g, or t

<220>
20 <221> misc_feature
   <222> (30)..(30)
   <223> n is a, c, g, or t

<220>
25 <221> misc_feature
   <222> (33)..(33)
   <223> y = c or t

<400> 5 33
30 wsnyntncarc argtntggaa ytgggngcn aay      33

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
35 <213> Humicola insolens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(2)
40 <223> x= xaa

      Xaa Xaa Gln Gln Val Trp Asn Trp Gly Ala
<400> 6 1                5                10

```


ES 2 490 608 T3

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Humicola insolens
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> r= a or g
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n is a, c, g, or t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n is a, c, g, or t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> r= a or g
 25
 <400> 7
 ggcgggcgcc gtcrtanccn ggrta 25
 30
 <210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Humicola insolens
 35
 <400> 8
 ctacacgggc actgttgctg gctgga 27
 40
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Humicola insolens
 <400> 9
 aactgggcc aggacggcgc tcgatat 27

ES 2 490 608 T3

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
5 <213> Humicola insolens

<400> 10
acacaactgg ccatgaaggt cccgactctc atctcg 36

10 <210> 11
<211> 36
<212> DNA
<213> Humicola insolens

15 <400> 11
cagtcacctc tagttattac aggcactgag agtacc 36

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado con actividad de acetilxilano esterasa, seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2;
un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida al menos bajo condiciones de astringencia altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria entera de (i) o (ii);
- 10 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 2; o un fragmento de la misma que tiene actividad de acetilxilano esterasa.
- 15 3. Polipéptido según la reivindicación 1, que es codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n°: 1; o una subsecuencia de la misma que codifica un fragmento con actividad de acetilxilano esterasa.
- 20 4. Polipéptido según la reivindicación 1, que es codificado por el polinucleótido contenido en plásmido pHinsAXE2 el cual está contenido en E. coli NRRL B-50076.
5. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5 operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
7. Célula huésped no-humana recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 6.
- 30 8. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende: (a) cultivar una célula huésped según la reivindicación 7 que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- 35 9. Método para producir un mutante de una célula madre, que comprende interrumpir o delecionar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, lo que provoca que el mutante produzca menos polipéptido que la célula madre.
- 40 10. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende: (a) cultivar una planta o una célula vegetal, que es transgénica para un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- 45 11. Planta, parte de planta o célula vegetal transgénica transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
12. Molécula de ARN bicatenario (ARNdc) inhibitorio que comprende una subsecuencia del polinucleótido según la reivindicación 5.
- 50 13. Molécula de ARN bicatenario (ARNdc) inhibitorio que comprende una subsecuencia del polinucleótido según la reivindicación 12, donde el ARNdc es una molécula de ARNip o miARN.
14. Método para inhibir la expresión de un polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa en una célula, que comprende administrar a la célula o expresar en la célula una molécula de ARN bicatenario (ARNdc), donde el ARNdc comprende una subsecuencia del polinucleótido según la reivindicación 5.
- 55 15. Constructo de ácidos nucleicos que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada a una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID n°: 2, donde el gen es extranjero a la secuencia de nucleótidos.
- 60 16. Célula huésped no-humana recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 15.
17. Método para producir una proteína, que comprende: (a) cultivar la célula huésped recombinante según la reivindicación 16 bajo condiciones propicias para la producción de la proteína; y (b) recuperar la proteína.
- 65

18. Método para degradar un material que contiene xilano, que comprende tratar el material que contiene xilano con el polipéptido con actividad de acetilxilano esterasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5 19. Método según la reivindicación 18, que comprende además tratar el material que contiene xilano con una enzima degradadora de xilano.


```

937      GGGCCCAACCTGGTGGCAATCTACGGCAGGGGGTCCACCCACACATCCCGGTCACAGGCGCCACCGACATG
      E W F G I T G N P T T T S T S A T V P T T S S
1009     GAATGGTTCGGCATCACCGGCAACCCGACCCACCTCGAGCTGTGCTACTGTGGCTACTACCCAGGCGAGC
      P G T T S T S A P V T T I T S R A P P P F T Q T
1081     CCGGGACCCNCTCGACCCAGGCCCGGTCACCCAGGCCACCTCCCGGGCTCCCTCCCGCTCCTACCCAGACT
      C I F V P R W G Q C G G I T W G G C T V C E A F
1153     TGTATACCCGTTCCCTCGTTGGGCCAGTGGGGGGGCTACCTGGGGAGGCTGCACGGTGTGCGHGGGGCGG
      Y T C Q K L N D W Y S Q C L *
1225     TACACTGGCCAGACCTGATGATGGTACTCTCAGTGCCTGTAA

```

Fig. 1B

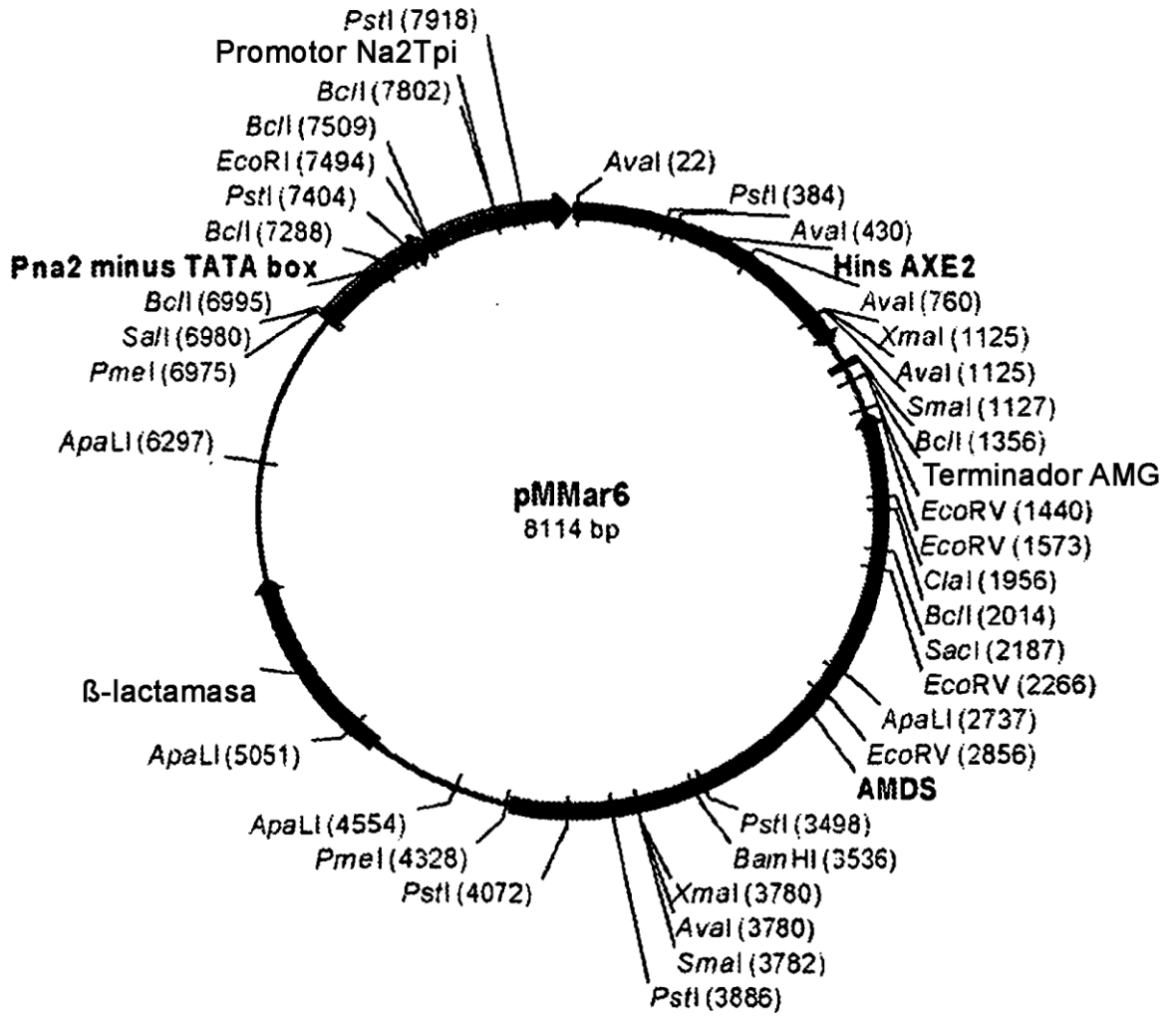


Fig. 2

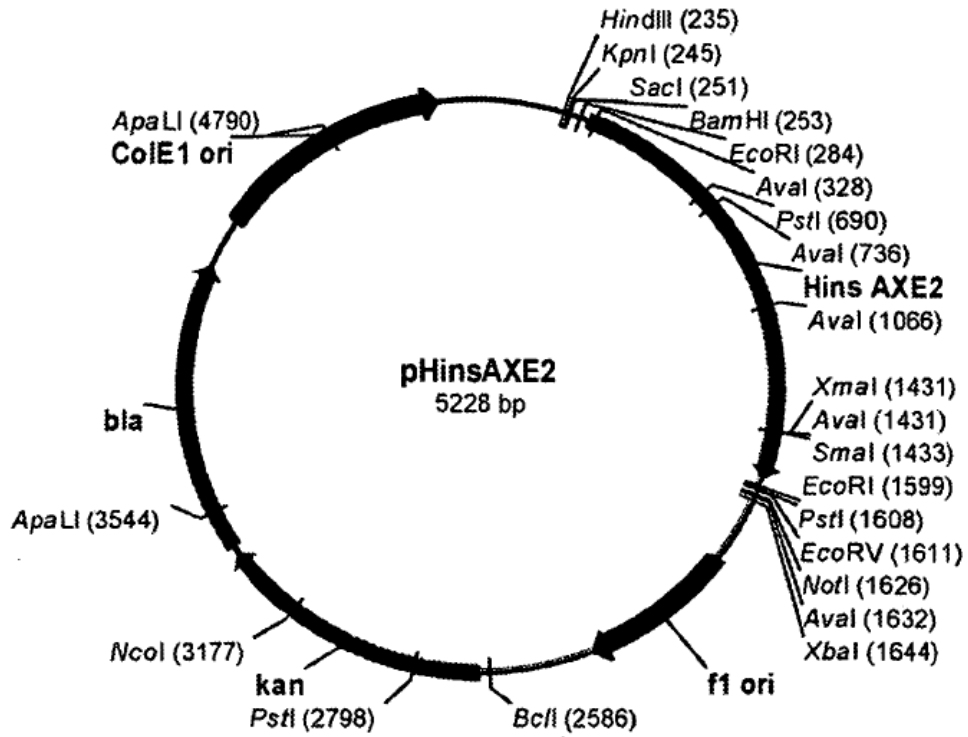


Fig. 3