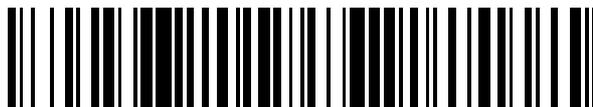


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 368**

21 Número de solicitud: 201331109

51 Int. Cl.:

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.01.2015

71 Solicitantes:

**ABENGOA BIOENERGÍA NUEVAS
TECNOLOGÍAS, S.A. (100.0%)
C/ Energía Solar, 1 Campus Palmas Altas
41014 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**DÍEZ GARCÍA, Bruno;
GÓMEZ RODRÍGUEZ, Ana;
GIL MARTÍNEZ, Jorge;
VALBUENA CRESPO, Noelia;
MORENO PÉREZ, Antonio Javier;
DUEÑAS SÁNCHEZ, Rafael;
MUÑOZ GONZÁLEZ, Ana María;
PÉREZ GÓMEZ, Dolores;
GAVALDÁ MARTÍN, Sandra;
MARTÍN PÉREZ, Lucía;
SÁNCHEZ ZAMORANO, Laura;
ÁLVAREZ NÚÑEZ, Consolación;
BERMÚDEZ ALCÁNTARA, María De Los Ángeles;
GUTIÉRREZ GÓMEZ, Pablo y
ARJONA ANTOLÍN, Ricardo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Célula hospedadora de Myceliophthora thermophila que expresa una enzima alfa-xilosidasa heteróloga y su uso en un procedimiento de degradación de biomasa**

57 Resumen:

Célula hospedadora de Myceliophthora thermophila que expresa una enzima alfa-xilosidasa heteróloga y su uso en un procedimiento de degradación de biomasa.

La presente invención se refiere a una célula hospedadora de Myceliophthora thermophila que expresa una alfa-xilosidasa, preferiblemente la alfa-xilosidasa Ataxi de Aspergillus terreus, el uso de esta célula hospedadora para la degradación de biomasa lignocelulósica y un procedimiento para la producción de bioetanol que comprende el uso de dicha célula hospedadora.

ES 2 527 368 A1

CÉLULA HOSPEDADORA DE *MYCELIOPHTHORA THERMOPHILA* QUE EXPRESA UNA ENZIMA ALFA-XILOSIDASA HETERÓLOGA Y SU USO EN UN PROCEDIMIENTO DE DEGRADACIÓN DE BIOMASA

5

DESCRIPCIÓN

La invención se refiere al campo de los biocombustibles, y más particularmente, a la expresión de enzimas con actividad alfa-xilosidasa en células hospedadoras y su uso en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.

10

TÉCNICA ANTERIOR

La biomasa vegetal proporciona una fuente abundante de energía potencial en forma de azúcares que pueden utilizarse para numerosos procesos industriales y agrícolas y, por lo tanto, es un importante recurso renovable para la generación de azúcares fermentables, dado que la fermentación de estos azúcares puede producir productos finales comercialmente valiosos, tales como el bioetanol. Sin embargo, el enorme potencial energético de estos carbohidratos actualmente no se utiliza en su totalidad debido a que los azúcares están formando parte de polímeros complejos y, por lo tanto, no son fácilmente accesibles para la fermentación (WO2012018691A2).

La madera, los residuos agrícolas, los cultivos herbáceos y los residuos sólidos urbanos se han considerado materias primas potenciales para la producción de etanol. Estos materiales contienen principalmente celulosa, hemicelulosa y/o lignina. Una vez que la celulosa se convierte en glucosa por medio de un proceso hidrolítico enzimático o sacarificación, la glucosa se fermenta fácilmente por levaduras hasta etanol. Por lo tanto, cuanto mayor es la cantidad de azúcares complejos que permanecen al final del proceso hidrolítico menor es el rendimiento de la producción de etanol al final del proceso de fermentación. Por lo tanto, un área de investigación dirigida a disminuir los costes y mejorar el rendimiento de los procesos de producción de biocombustible está centrada en la mejora de la eficacia técnica de las enzimas hidrolíticas que pueden usarse para generar azúcares fermentables a partir de la biomasa.

Debido a la complejidad de la biomasa, su conversión en azúcares monoméricos implica la acción de diferentes clases de enzimas, que digieren celulosa y hemicelulosa, polisacáridos principales comprendidos en los materiales celulósicos. El xiloglucano es, junto con el xilano, uno de los polisacáridos hemicelulolíticos principales presentes en la pared celular de las plantas. Este polisacárido consiste en una cadena central de glucano (beta 1,4-glucosa), ramificada con sustituciones alfa 1,6-xilosa, a las que a su vez pueden unirse beta-galactosa y alfa-fucosa (Stephen C. Fry 1989, J. Exp. Bot. 40 (1): 1-11). Aunque las endo-xilanasas y las beta-xilosidasas son capaces de degradar el xilano hasta xilosa, la hidrólisis del xiloglucano requiere la acción combinada de varias enzimas, liberando como productos finales azúcares fermentables, principalmente glucosa y xilosa.

Se ha demostrado que enzimas individuales son únicamente capaces de digerir parcialmente la celulosa y la hemicelulosa y, por lo tanto, se requiere la acción concertada de diferentes clases de enzimas para completar su conversión en azúcares monoméricos. Se requieren muchas más enzimas para digerir la hemicelulosa hasta azúcares monoméricos que la celulosa, incluyendo enzimas con actividad xilanasa, beta-xilosidasa, arabinofuranosidasa, mananasa, galactosidasa y glucuronidasa. También pueden estar involucradas otras enzimas sin actividad glicosil hidrolasa, tales como acetil xilano esterasa y ácido ferúlico esterasa.

20

Se ha descubierto que un gran número de organismos de origen natural llevan a cabo la hidrólisis enzimática de los materiales celulósicos para producir azúcares fermentables. Los organismos capaces de realizar una degradación completa de celulosa y hemicelulosa, que posteriormente permita una fermentación eficiente, mejorarían en gran medida la rentabilidad de la producción de bioetanol. Así, algunos esfuerzos realizados con el fin de generar mejores microorganismos que expresan enzimas celulolíticas, han implicado la inserción de un gen que codifica la enzima hidrolítica específica a expresar, bajo el control de fuertes señales de expresión, lo que da lugar a una mayor estabilidad de el ARNm transcrito o un aumento del número de copias del gen en el organismo producido (US20080194005A1).

La eficiencia hidrolítica de un complejo multi-enzimático en el proceso de sacarificación

lignocelulósico depende tanto de las propiedades de las enzimas individuales como de la proporción de cada enzima presente en el complejo. Por lo tanto, es deseable generar microorganismos que expresen enzimas celulolíticas que mejoren el rendimiento del proceso de degradación del material lignocelulósico, incrementando la cantidad de azúcares fermentables liberados y mejorando de esta manera el rendimiento de la producción de biocombustibles.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 La presente invención describe una célula hospedadora de *Myceliophthora thermophila* que expresa una alfa-xilosidasa recombinante, preferiblemente la alfa-xilosidasa AtaxI (SEQ ID NO: 2) de *Aspergillus terreus*. Esta célula hospedadora da lugar a un aumento de la eficiencia de la hidrólisis de material lignocelulósico en azúcares fermentables, más particularmente, mejorando la degradación de xiloglucano hasta xilosa. La invención
15 también proporciona un procedimiento de producción de bioproductos, preferiblemente, biocombustible, con dicha célula hospedadora o con la composición enzimática producida por ésta.

La presente invención representa una solución a la necesidad de disponer de un
20 microorganismo que exprese una mezcla de enzimas celulolíticas que mejore el rendimiento del proceso de degradación de la biomasa, aumentando la cantidad de azúcares fermentables liberados y mejorando así el rendimiento de la producción de biocombustible.

Aproximadamente el 20-30% de la xilosa presente en los polisacáridos constituyentes de la
25 biomasa lignocelulósica no se libera en el proceso de hidrólisis enzimática de la biomasa. La célula hospedadora de la invención expresa una alfa-xilosidasa capaz de participar en la degradación de xiloglucano hasta xilosa. Por lo tanto, esta célula hospedadora es útil para la optimización de la etapa de hidrólisis de la biomasa hasta azúcares fermentables.

30 Los inventores han demostrado que la mezcla enzimática producida por la célula hospedadora de *M. thermophila* de la invención, que expresa la alfa-xilosidasa heteróloga, da lugar a una mayor concentración de xilosa liberada a partir de xiloglucano que una

mezcla enzimática producida por una célula de *M. thermophila* que no expresa la alfa-xilosidasa heteróloga. Por lo tanto, la célula hospedadora de la invención es ventajosa puesto que su uso, o el uso de un cóctel enzimático producido por ésta, en un procedimiento de hidrólisis de material lignocelulósico, aumenta la concentración de azúcares fermentables 5 liberados a partir de biomasa lignocelulósica y, por lo tanto, el rendimiento total de la producción de biocombustible.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora de *M. thermophila* que expresa una alfa-xilosidasa, de ahora en adelante "célula 10 hospedadora de la invención".

El término "alfa-xilosidasa" como se usa aquí, se refiere a una enzima que pertenece a la familia 31 de las glicosil hidrolasas y cataliza la liberación de alfa-xilosa unida a la glucosa terminal no reductora del xiloglucano.

15

Las alfa-xilosidasas que pueden expresarse en la célula hospedadora de la invención son, por ejemplo, las producidas por microorganismos tales como bacterias (Larsbrink y col., 2011) u hongos, preferiblemente hongos, más preferiblemente hongos del género *Aspergillus*. Por lo tanto, en una realización más preferida, la alfa-xilosidasa se obtiene a 20 partir de un microorganismo del género *Aspergillus*. En una realización aún más preferida, el hongo *Aspergillus* es *Aspergillus terreus*. Una alfa-xilosidasa de *A. terreus* es, por ejemplo, la enzima madura SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida, la alfa-xilosidasa expresada por la célula hospedadora de la 25 invención, comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 70%, 76%, 79%, 80%, 83%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la alfa-xilosidasa expresada por la célula hospedadora de la invención comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 76% idéntica a la SEQ ID NO: 2. Ejemplos de alfa-xilosidasas que son al menos un 70% idénticas a la SEQ ID NO: 2 son alfa-xilosidasas de 30 *Aspergillus flavus* (número de acceso al GenBank XP_002378848.1, 84% idéntica a la SEQ ID NO: 2), *A. oryzae* (número de acceso al GenBank EIT81731.1, 84% idéntica a la SEQ ID NO: 2), *A. oryzae* (número de acceso al GenBank XP_001823456.1, 84% idéntica a la SEQ

ID NO: 2), *Neosartorya fischeri* (número de acceso al GenBank XP_001265600.1, 82% idéntica a la SEQ ID NO: 2), *Aspergillus kawachii* (número de acceso al GenBank GAA91593.1, 82% idéntica a la SEQ ID NO: 2), *A. niger* (número de acceso al GenBank XP_001393647.1, 81% idéntica a la SEQ ID NO: 2), *Macrophomina phaseolina* (número de acceso al GenBank EKG20540.1, 72% idéntica a la SEQ ID NO: 2), *Baudoinia compniacensis* (número de acceso al GenBank EMC94364.1, 71% idéntica a la SEQ ID NO: 2), *Neofusicoccum parvum* (número de acceso al GenBank EOD53148.1, 71% idéntica a la SEQ ID NO: 2).

10 El término "identidad" como se usa aquí, en el contexto de describir dos o más secuencias polipeptídicas, se refiere a un porcentaje determinado de correspondencias de residuos aminoacídicos en las posiciones de un alineamiento de dos secuencias aminoacídicas. Se conocen bien en la técnica procedimientos de alineamiento de secuencias para su comparación. El grado de identidad puede determinarse por el método Clustal, el método
15 Wilbur-Lipman, el programa GAG, incluyendo GAP, BLAST o BLASTN, EMBOSS Needle y FASTA. Además, puede usarse el algoritmo Smith Waterman para determinar el grado de identidad entre dos secuencias.

En otra realización preferida, dicha alfa-xilosidasa comprende la secuencia aminoacídica
20 SEQ ID NO: 2. Esta SEQ ID NO: 2 es la alfa-xilosidasa madura de *Aspergillus terreus*, que también se denomina AtaxI. Un ejemplo de una alfa-xilosidasa que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2 es la preproteína SEQ ID NO: 3, que consiste en la SEQ ID NO: 2 unida a un péptido señal de 18 aminoácidos en el extremo N-terminal del polipéptido. En una realización más preferida, dicha alfa-xilosidasa consiste en la secuencia aminoacídica
25 SEQ ID NO: 2.

La expresión de la alfa-xilosidasa en la célula hospedadora de la invención puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como la transformación de una célula hospedadora de *M. thermophila* adecuada con una o más secuencias de ácido nucleico que
30 codifican una alfa-xilosidasa, preferiblemente la alfa-xilosidasa descrita aquí, y el cultivo de la célula hospedadora transformada bajo condiciones que inducen la expresión de dicha/s secuencia/s de ácido nucleico para obtener la enzima secretada. La/s secuencia/s de ácido

nucleico que codifican la alfa-xilosidasa pueden codificar el polipéptido maduro o la preproteína que consiste en un péptido señal unido a la enzima madura que tendrá que procesarse posteriormente. La/s secuencia/s de ácido nucleico que codifican la alfa-xilosidasa pueden incluirse en una construcción génica, preferiblemente en un vector de 5 expresión. Dicha construcción genética puede comprender adicionalmente una o más secuencias reguladoras o de control de la expresión génica, tales como promotores, terminadores, etc.

De acuerdo con la presente invención, una "secuencia de ácido nucleico" o un 10 "polinucleótido" es una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) que se ha aislado de su entorno natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana) y puede incluir ADN, ARN o derivados de ADN o ARN, incluyendo ADNc. La secuencia nucleotídica que codifica la alfa-xilosidasa descrita en la presente invención puede o no modificarse química o bioquímicamente y puede producirse de forma artificial por medio de procedimientos de 15 clonación y selección o por secuenciación. Preferiblemente, en la presente invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica la alfa-xilosidasa consiste en la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 1, que codifica la preproteína SEQ ID NO: 3 que se procesará posteriormente en la célula hospedadora con el fin de producir la alfa-xilosidasa madura SEQ ID NO: 2.

20

La expresión "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifique la alfa-xilosidasa descrita en la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o externa a la secuencia nucleotídica que codifica la alfa-xilosidasa. Dichas secuencias de 25 control incluyen, pero sin limitación, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador transcripcional. Como mínimo, las secuencias de control incluyen una secuencia de péptido señal, preferiblemente los aminoácidos 1 a 18 de la SEQ ID NO: 3, y preferiblemente un promotor, y señales de terminación transcripcionales y traduccionales. Las secuencias de 30 control pueden proporcionarse con enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia nucleotídica que codifica la alfa-xilosidasa. La expresión "unida operativamente"

representa aquí una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia polinucleotídica de tal forma que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de la alfa-xilosidasa.

5

La expresión "vector de expresión" se define aquí como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica la alfa-xilosidasa como se describe aquí, y que está unido operativamente a nucleótidos adicionales que proporcionan su expresión. Dicho vector, que comprende un polinucleótido que codifica la alfa-xilosidasa, se introduce en la célula hospedadora de manera que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extra-cromosómico auto-replicante.

La secuencia nucleotídica que codifica la alfa-xilosidasa descrita aquí puede expresarse insertando la secuencia nucleotídica, o una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia, en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se sitúa en el vector de manera que la secuencia codificante esté unida operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión. Los vectores de expresión a los que se hace referencia en la presente invención, comprenden un polinucleótido que codifica la alfa-xilosidasa descrita aquí, un promotor, y señales de terminación transcripcionales y traduccionales. Las diversas secuencias de ácidos nucleicos y de control descritas aquí pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o la sustitución de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima en dichos sitios.

25

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y pueda conseguir la expresión de la secuencia nucleotídica.

30 Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados. El vector puede ser un vector replicante autónomo, es decir, un vector que existe en forma de 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 auto-replicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, al introducirse en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma o los cromosomas en los que se ha
5 integrado. Además, puede usarse un vector individual o un plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que contengan juntos el ADN total que se introducirá en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón.

Los vectores usados en la presente invención contienen preferiblemente uno o más
10 marcadores de selección que permiten una fácil selección de las células transformadas. Un marcador de selección es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a los metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Los marcadores de selección para su uso en una célula hospedadora fúngica filamentosa incluyen, pero sin limitación, amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfinotricina
15 acetil transferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato reductasa), pyrG (orotidin-5'-fosfato descarboxilasa), pyr5, cysC (sulfato adeniltransferasa), y trpC (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos.

Los vectores usados en la presente invención contienen preferiblemente uno o más
20 elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma. Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede depender de la secuencia de polinucleótidos que codifica la enzima alfa-xilosidasa o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga.
25 Como alternativa, el vector puede contener secuencias nucleotídicas adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en una localización o localizaciones precisas en el cromosoma o los cromosomas.

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender adicionalmente un origen de
30 replicación que permita que el vector se replique de forma autónoma en la célula hospedadora en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquiera que posibilite la replicación autónoma del vector en la célula. La expresión "origen de replicación" o

"replicador plasmídico" se define aquí como una secuencia nucleotídica que permite que un plásmido o un vector se repliquen *in vivo*. Ejemplos de orígenes de replicación útiles en células de hongos filamentosos son AMAI y ANSI.

5 Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido que codifica la alfa-xilosidasa descrita en la presente invención en la célula hospedadora para aumentar la producción del producto génico. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un gen marcador de selección amplificable con el polinucleótido,
10 donde las células que contienen copias amplificadas del marcador de selección, y por tanto las copias adicionales del polinucleótido, pueden seleccionarse cultivando las células en presencia del agente selectivo apropiado. Los procedimientos usados para unir los elementos que se han descrito anteriormente para construir los vectores de expresión a los que se hace referencia en la presente invención, se conocen bien por los expertos en la
15 técnica.

La secuencia nucleica incluida en la célula hospedadora de la invención puede codificar la SEQ ID NO: 2, que es la alfa-xilosidasa madura de *A. terreus*, o puede codificar una preproteína que consiste en un péptido señal unido a dicha enzima madura. Esta
20 preproteína tendrá que procesarse posteriormente en la célula hospedadora para producir la enzima alfa-xilosidasa madura. Esta preproteína puede ser, pero sin limitación, el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, que consiste en el péptido señal nativo de la alfa-xilosidasa AtaxI de *A. terreus*, que corresponde a los aminoácidos 1 a 18 de la SEQ ID NO: 3, unido a la SEQ ID NO: 2. La preproteína SEQ ID NO: 3 es la preproteína nativa expresada en *A. terreus*.
25 Preferiblemente, la célula hospedadora de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 3, más preferiblemente dicha secuencia de ácido nucleico es SEQ ID NO: 1 y, por lo tanto, dicha célula expresa la preproteína SEQ ID NO: 3 que se procesará en dicha célula para expresar la enzima alfa-xilosidasa madura que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.

30

La célula hospedadora de la invención puede ser cualquier cepa de la especie *M. thermophila*. En otra realización más preferida, la célula hospedadora de la invención es la

cepa C1 de *M. thermophila*. Se entenderá que para la especie que se ha mencionado anteriormente, la invención incluye tanto estados perfectos como imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el que se conoce. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la
5 identidad de los equivalentes apropiados. Por lo tanto, *M. thermophila* es equivalente a *Chrysosporium lucknowense*.

El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de la alfa-xilosidasa descrita aquí, incluyendo, pero sin limitación, la transcripción, la modificación
10 post-transcripcional, la traducción, la modificación post-traducciona l y la secreción.

La célula hospedadora de la invención expresa una enzima alfa-xilosidasa funcional y es capaz de secretarla al medio extracelular. El término "funcional" significa que la enzima expresada retiene su capacidad para hidrolizar la glucosa terminal no reductora de
15 xiloglucano en alfa-xilosa. Esta actividad puede medirse por medio de cualquier procedimiento adecuado conocido en el estado de la técnica para evaluar la actividad alfa-xilosidasa, preferiblemente por medio del procedimiento descrito a continuación en los ejemplos de la presente invención (medida utilizando *p*-nitrofenil-alfa-xilopiranosido como sustrato).

20

La célula hospedadora puede cultivarse en un medio nutritivo adecuado para la producción de la alfa-xilosidasa usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse mediante cultivo agitado en matraz, y fermentación a pequeña o gran
25 bioreactor de laboratorio o industrial, realizada en un medio adecuado y en condiciones que permitan que la alfa-xilosidasa se exprese y/o se aísle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Están disponibles medios adecuados a partir de proveedores comerciales, o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones
30 publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*)). Cuando la alfa-xilosidasa se secreta en el medio de cultivo, puede recuperarse directamente del mismo.

La alfa-xilosidasa expresada puede detectarse usando procedimientos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos procedimientos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, o la desaparición de un sustrato enzimático.

5

La alfa-xilosidasa resultante puede recuperarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la alfa-xilosidasa puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

10

La alfa-xilosidasa producida en la presente invención puede purificarse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoco, y exclusión molecular), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción, con el fin de obtener una alfa-xilosidasa sustancialmente pura que pueda incluirse en una composición enzimática junto con otras enzimas celulolíticas.

En una realización más preferida, la célula hospedadora de la invención también expresa
20 otras enzimas celulolíticas.

Las expresiones "enzimas celulolíticas" o "celulasas", como se usan en la presente invención, se refieren a una categoría de enzimas capaces de hidrolizar celulosa (β -1,4-glucano o enlaces β -D-glucosídicos) o hemicelulosa en oligosacáridos más cortos, 25 celobiosa, xilobiosa, xilosa y/o glucosa. Ejemplos de enzimas celulolíticas son, pero sin limitación, endoglucanasas, beta-glucosidasas, celobiohidrolasas, endoxilanasas, endoxiloglucanasas o beta-xilosidasas. Por lo tanto, en una realización aún más preferida, estas enzimas celulolíticas se seleccionan de la lista que consiste en: endoglucanasas, beta-glucosidasas, celobiohidrolasas, endoxilanasas, endoxiloglucanasas, beta-xilosidasas, o 30 cualquier combinación de las mismas. Estas enzimas celulolíticas pueden producirse de forma natural o recombinante.

El término "endoglucanasa" o "EG" se refiere a un grupo de enzimas celulasas que hidrolizan enlaces β -1,4 glucosídicos internos de celulosa.

El término "celobiohidrolasa" se refiere a una proteína que cataliza la hidrólisis de celulosa 5 en celobiosa a través de una actividad exoglucanasa, liberando secuencialmente moléculas de celobiosa de los extremos reductores o no reductores de la celulosa o celooligosacáridos. El término "endoxilanasas" se refiere a una proteína que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en xilanos.

10 El término "endoxiloglucanasa" se refiere a una enzima específica de xiloglucano, capaz de catalizar la solubilización de xiloglucano en oligosacáridos pero que no muestra una actividad celulolítica sustancial.

El término " β -xilosidasa" se refiere a una proteína que hidroliza 1,4- β -D-xilooligómeros cortos 15 hasta xilosa.

El término "beta-glucosidasa" se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de un dímero de azúcar, incluyendo, pero sin limitación, celobiosa, con la liberación de un monómero de azúcar correspondiente, usado, pero sin limitación, para la síntesis de etanol. La enzima 20 beta-glucosidasa actúa sobre enlaces β 1- \rightarrow 4 que unen dos moléculas de glucosa o sustituyentes de glucosa (es decir, el disacárido celobiosa). Es una exocelulasa con especificidad para una diversidad de sustratos beta-D-glicósido. Cataliza la hidrólisis de los residuos terminales no reductores en beta-D-glicósidos con liberación de glucosa.

25 La desconstrucción completa del xiloglucano requiere la participación de múltiples enzimas. Entre ellas, la alfa-xilosidasa elimina los residuos de xilosa unidos a alfa-1,6, y las beta1,4-glucanasas junto con la beta-glucosidasa despolimerizan la estructura del glucano. Algunas beta-1,4-glucanasas son xiloglucanasas, es decir, pueden hidrolizar enlaces de beta-1,4-glucano en glucanos sustituidos, tales como xiloglucano, mientras que otras 1,4-glucanasas 30 únicamente actúan sobre 1,4-glucanos no sustituidos, tales como celulosa. Por lo tanto, la actividad alfa-xilosidasa en una composición enzimática para la etapa de hidrólisis del material lignocelulósico en azúcares fermentables en procesos de producción de etanol, es

interesante para mejorar la actividad de toda la composición enzimática.

Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición, en lo sucesivo "composición de la invención", que comprende la célula hospedadora de la
5 invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición enzimática producida por la célula hospedadora de la invención.

10 En una realización preferida, las composiciones de la invención comprenden adicionalmente otras enzimas celulolíticas. En una realización más preferida, las otras enzimas celulolíticas se seleccionan de la lista que consiste en: endoglucanasas, beta-glucosidasas, celobiohidrolasas, endoxilanasas, endoxiloglucanasas, beta-xilosidasas o cualquier combinación de las mismas.

15

Las composiciones de la invención pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o una composición seca. Por ejemplo, las composiciones pueden estar en forma de un granulado o un microgranulado. Las enzimas que se incluirán en las composiciones pueden

20 estabilizarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención o las composiciones de la invención para la degradación de la biomasa.

25 El término "biomasa" se refiere a la fracción biodegradable de productos, desechos y residuos de origen biológico de la agricultura (incluyendo plantas, tales como residuos de cultivos y sustancias animales), forestales (tales como recursos madereros) e industrias relacionadas, que incluyen actividades pesqueras y acuícolas, así como a la fracción biodegradable de residuos industriales y urbanos, tales como residuos sólidos urbanos o
30 desechos de papel. En una realización preferida, la biomasa es paja o una fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. En una realización más preferida, la biomasa es biomasa vegetal, más preferiblemente seleccionada de la lista que consiste en: biomasa rica en

azúcares fermentables, tales como caña de azúcar, biomasa de almidón, por ejemplo, grano de trigo o paja de maíz.

La célula hospedadora de la presente invención puede usarse como una fuente del 5 polipéptido que tiene actividad alfa-xilosidasa, y otras enzimas celulolíticas, en un proceso de fermentación de la biomasa.

El polisacárido predominante en la pared celular primaria de la biomasa es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa, y el tercero es pectina. La pared celular 10 secundaria, producida después de que la célula ha dejado de crecer, también contiene polisacáridos y se consolida a través de lignina polimérica covalentemente unida a la hemicelulosa. La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y, por lo tanto, un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras que las hemicelulosas incluyen una diversidad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos, y mananos en estructuras 15 ramificadas complejas con un espectro de sustituyentes. Aunque generalmente polimorfa, la celulosa se encuentra en el tejido vegetal, sobre todo como una matriz cristalina insoluble de cadenas paralelas de glucano. Las hemicelulosas se unen normalmente a través de enlaces de hidrógeno a la celulosa, así como a otras hemicelulosas, lo que ayuda a estabilizar la matriz de la pared celular. La enzima alfa-xilosidasa producida por la célula hospedadora de 20 la invención puede usarse junto con otras enzimas celulolíticas para degradar adicionalmente el componente celulósico del sustrato de biomasa.

La degradación o hidrólisis de la biomasa en azúcares fermentables, proceso también conocido como "sacarificación", por medio de la célula hospedadora de la invención, o las 25 composiciones de la invención, puede ir seguido de un proceso de fermentación en el que los azúcares fermentables obtenidos se usan para obtener finalmente un bioproducto, tal como bioetanol.

Por lo tanto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la 30 célula hospedadora de la invención, o las composiciones de la invención, para la degradación de la biomasa en un proceso de producción de un bioproducto.

Las expresiones "bioproducto" o "productos basados en productos biológicos" se refieren a los materiales, productos químicos y energía obtenidos a partir de recursos biológicos renovables. Ejemplos de estos bioproductos son, pero sin limitación, compuestos hidrocarbonados en sus diferentes formas, tales como alifáticos (saturados, insaturados, 5 cíclicos) o aromáticos, como alcanos, alquenos, alquinos, formas cíclicas de estos compuestos o hidrocarburos aromáticos; sustancias oxigenadas, tales como alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas o ácidos carboxílicos; sustancias nitrogenadas como aminas, amidas, nitrocompuestos o nitrilos; sustancias halogenadas, como haluros. El término "bioproductos" incluye también cualquier combinación de los compuestos que se han 10 descrito anteriormente, compuestos obtenidos adicionalmente a partir de los compuestos que se han descrito anteriormente mediante cualquier tipo de tratamiento físico, químico o biológico, polímeros de los compuestos que se han descrito anteriormente, compuestos que se han descrito anteriormente sustituidos con cualquier grupo o elemento funcional en uno o más de sus enlaces o formas ramificadas de los compuestos que se han descrito 15 anteriormente.

Puede producirse etanol por degradación enzimática de la biomasa y la conversión de los sacáridos liberados en etanol. Este tipo de etanol a menudo se denomina bioetanol. Puede usarse como un aditivo de combustible o un extensor en mezclas de menos del 1% y hasta 20 el 100% (un sustituto de combustible).

En una realización más preferida el bioproducto es un biocombustible. El término "biocombustible" como se usa aquí, se refiere a un hidrocarburo, o una mezcla del mismo, que puede usarse como combustible y se obtiene usando biomasa fermentable como 25 material de partida. Ejemplos de biocombustibles incluyen, pero sin limitación, etanol o bioetanol y biodiésel. En una realización más preferida, el biocombustible es bioetanol.

El término "bioetanol" se refiere a un alcohol hecho por fermentación, sobre todo a partir de biomasa fermentable, tal como carbohidratos producidos en cultivos de azúcar o almidón, 30 tales como maíz o caña de azúcar.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de

azúcares fermentables, en lo sucesivo "primer procedimiento de la invención", que comprende:

- 5 a) Incubar biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, con la célula hospedadora de la invención o con cualquiera de las composiciones de la invención, y
- b) Recuperar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación en la etapa (a).

Con frecuencia, se requiere un proceso de pretratamiento de la biomasa para aumentar el
10 acceso de las enzimas a sus sustratos y en consecuencia, la eficiencia de la hidrólisis. El pretratamiento usa diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, explosión de la fibra con amoníaco, tratamiento químico y explosión con vapor a altas temperatura para alterar la estructura de la biomasa celulósica y hacer a la celulosa más accesible. El uso de la célula hospedadora de la invención o las composiciones de la invención en los procedimientos de
15 la presente invención es ventajoso, ya que no se requieren altas temperaturas en el proceso de pretratamiento de la biomasa.

La expresión "azúcar fermentable", como se usa aquí, se refiere a azúcares simples, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ranmosa, sacarosa o fructosa, entre
20 otros.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un bioproducto a partir de biomasa, en lo sucesivo "segundo procedimiento de la invención", que comprende:

25

- a) Incubar biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, con la célula hospedadora de la invención o con cualquiera de las composiciones de la invención para provocar la hidrólisis enzimática de dicha biomasa,
- b) Fermentar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la
30 etapa (a) con al menos un microorganismo fermentador, y
- c) Recuperar el bioproducto obtenido después de la fermentación en la etapa (b).

Antes (es decir en la etapa (a)) y/o simultáneamente con la fermentación de la etapa (b), la biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, se hidroliza para degradar la celulosa y la hemicelulosa en azúcares y/o oligosacáridos. El contenido en sólidos durante la hidrólisis puede estar, pero sin limitación, comprendido entre el 5-40% del peso total, preferiblemente 5 entre el 10-40% del peso total, más preferiblemente entre el 10-20% del peso total. La hidrólisis se realiza como un proceso en el que la biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, se incuba con la célula hospedadora de la invención o con cualquiera de las composiciones de la invención que contienen enzimas hidrolíticas y forman así la solución de hidrólisis. El tiempo de proceso adecuado, la temperatura y las condiciones de pH 10 pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Preferiblemente, dicha hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25 °C y 60 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, específicamente alrededor de 50 °C. El proceso se realiza preferiblemente a un pH en el intervalo de 3-8, preferiblemente pH 4-6, especialmente alrededor de pH 5. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza en un tiempo comprendido entre 12 y 144 horas, preferiblemente entre 15 16 y 120 horas, más preferiblemente entre 24 y 96 horas, incluso más preferiblemente entre 32 y 72 horas.

La hidrólisis (etapa (a)) y la fermentación (etapa (b)) pueden realizarse simultáneamente (proceso SSF) o secuencialmente (proceso SHF). De acuerdo con la invención, la biomasa 20 hidrolizada, y preferiblemente pretratada, se fermenta por al menos un microorganismo fermentador capaz de fermentar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, mannososa y galactosa directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en un tiempo comprendido entre 8 y 96 horas, preferiblemente entre 12 y 72, más preferiblemente entre 24 y 48 horas. En otra realización 25 preferida, la fermentación se realiza a una temperatura entre 20 °C y 40 °C, preferiblemente de 26 °C a 34 °C, en particular alrededor de 32 °C. En otra realización preferida, el pH es de 3 a 6 unidades, preferiblemente de 4 a 5. Se prefiere para la fermentación etanólica una levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que sean resistentes a altos niveles de etanol, hasta, por ejemplo, el 5 o el 7% en vol. de etanol o 30 más, tal como el 100% en vol. de etanol.

La expresión "fermentador o fermentación" como se usa aquí, se refiere a un proceso de

transformación biológica provocado por la actividad de algunos microorganismos en el que los azúcares, tales como la glucosa, la fructosa y la sacarosa, se convierten en etanol. Por lo tanto, los microorganismos usados son microorganismos fermentadores, que tienen una capacidad de fermentación, tal como levadura, preferiblemente *S. cerevisiae*.

5

El término "recuperar" como se usa aquí, se refiere a la recolección de los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación en la etapa (a) del primer procedimiento de la invención o del bioproducto obtenido después de la fermentación de la etapa (b) del segundo procedimiento de la invención. La recuperación puede hacerse mediante cualquier
10 procedimiento conocido en la técnica, incluyendo procedimientos mecánicos o manuales.

En una realización preferida del segundo procedimiento de la invención, el bioproducto es biocombustible, más preferiblemente bioetanol.

15 A no ser que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden usarse en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones,
20 no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Serán evidentes otros objetos, ventajas y características adicionales de la invención para los expertos en la técnica tras el análisis de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, dibujos y la lista de secuencias se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el vector denominado pBASE5. Vector de expresión con *Pcbh1* como secuencia promotora, *Tcbh1* como secuencia de terminación y *pyr5* como marcador de
30 selección. *NdeI* y *EcoRI* fueron los sitios de restricción escogidos para clonar *atax1*.

Figura 2. Muestra el vector denominado pABC365. Plásmido de expresión del ADNc de

ataxl de *A. terreus*.

Figura 3. Muestra la actividad alfa-xilosidasa (U/L) de los transformantes *ataxl* analizados usando pN-alfa-XP como sustrato. La actividad alfa-xilosidasa se midió con 5 pN-alfa-XP como sustrato. La cepa parental no transformada de *M. thermophila* C1 se usó como control negativo de actividad alfa-xilosidasa.

Figura 4. Determinación de la actividad específica alfa-xilosidasa en la mezcla control y en las mezclas enzimáticas que contienen *Ataxl*. Se usó un heptasacárido de 10 xiloglucano como sustrato. Los números son el promedio de tres cultivos independientes para cada mezcla enzimática, y las desviaciones estándar se indican mediante barras.

EJEMPLOS

15 **Ejemplo 1. Construcción del plásmido para expresar el gen de alfa-xilosidasa de *Aspergillus terreus* (*ataxl*) en la cepa C1 de *M. thermophila*.**

La secuencia de ADNc del gen alfa-xilosidasa de *Aspergillus terreus* NIH2624 (número de acceso al GenBank: XM_001217011.1), denominada *ataxl*, se utilizó para expresar su 20 actividad enzimática en la presente invención. La secuencia de ADNc de *ataxl* se sintetizó *in vitro* después de su optimización para eliminar los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción más comunes sin alterar la secuencia aminoacídica. La secuencia nucleotídica de ADNc de *ataxl* y la secuencia aminoacídica deducida se muestran en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3, respectivamente. La secuencia codificante tiene 2238 pb de longitud, 25 incluyendo el codón de terminación. La preproteína predicha (SEQ ID NO: 3) tiene 745 aminoácidos de largo con una masa molecular estimada de 84 KDa y un punto isoelectrico de 5,01. Usando el programa Signal IP (Petersen y col., 2011, Signal IP 4.0, *Nature Methods*, 8: 785-786), se predijo un péptido señal correspondiente a los primeros 18 residuos del extremo N terminal. La proteína madura predicha (SEQ ID NO: 2) contiene 30 aminoácidos con una masa molecular estimada de 82 KDa y un punto isoelectrico de 4.96.

El ADNc de *ataxl* se sintetizó *in vitro* incluyendo la secuencia de las enzimas de restricción

NdeI y *EcoRI* en los extremos (*NdeI* en el extremo 5' y *EcoRI* en el extremo 3') con el fin de clonarse en un vector de expresión denominado pBASE5. El vector de expresión pBASE5 incluye la secuencia promotora del gen celobiohidrolasa 1 (*Pcbh1*), que consiste en una región de 1796 pb aguas arriba del gen celobiohidrolasa 1 (*cbh1*, número de acceso al GenBank XP_003660789.1) de la cepa C1 de *M. thermophila*. *Pcbh1* es un promotor fuerte. El vector de expresión pBASE5 también contenía la secuencia de terminación del gen celobiohidrolasa 1 de la cepa C1 de *M. thermophila* (*Tcbh1*, que corresponde a una región de 1014 pb aguas abajo de *cbh1*) y el gen *pyr5* (número de acceso al GenBank XP_003660657.1) de la misma cepa como marcador de selección. El gen *pyr5* codifica una orotato-fosforibosil transferasa funcional y su expresión permite la complementación de la auxotrofia de uridina en la correspondiente cepa hospedadora C1 auxotrófica de *M. thermophila* (*pyr5*⁻). El vector de expresión pBASE5 se muestra en la figura 1.

El ADNc de *ataxI* se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI* y se clonó en el pBASE5, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. El vector de expresión pBASE5 y *ataxI* se ligaron y el producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *Escherichia coli* XL1Blue MRF siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Stratagene). El plásmido recombinante obtenido se denominó pABC365 y se muestra en la figura 2.

20

Ejemplo 2. Expresión de *ataxI* en la cepa C1 de *M. thermophila*: transformación y determinación de la actividad alfa-xilosidasa.

El plásmido pABC365 que contenía el gen *ataxI* de *A. terreus* NIH2624 bajo la secuencia promotora *Pcbh1* y *pyr5* como marcador de selección, se transformó en la cepa hospedadora auxotrófica de *M. thermophila pyr5*⁻ (Verdoes y col., 2007, *Ind. Biotechnol.* 3 (1)), usada previamente en otras selecciones de alto rendimiento (*high-throughput screening*) en *M. thermophila*. El ADN se introdujo en la cepa hospedadora usando un procedimiento de transformación de protoplastos (US7399627B2). Los transformantes se sembraron en placas de agar sin suplemento de uridina. Después de 5 días de incubación a 35 °C, se analizaron los transformantes prototróficos resultantes (que expresan el gen *pyr5*).

Los transformantes obtenidos se inocularon en cultivos en placas de microtitulación de 96 pocillos (MTP) para realizar una selección de alto rendimiento (como se describe en US7794962B2). El objetivo de esta selección era identificar la actividad alfa-xilosidasa en los transformantes que expresan *ataxl* usando la cepa C1 de *M. thermophila* como control
5 negativo. El ensayo se basó en la hidrólisis de *p*-nitrofenil-alfa-xilopiranosido (pN-alfa-XP, Sigma). El porcentaje de actividad alfa-xilosidasa se determinó en base a la liberación de *p*-nitrofenol (medida por el aumento de la absorbancia a A_{410}) en unidades por litro de cultivo (U/L) (Matsuo y col., 1996, Biosci. Biotechnol. Biochem. 60 (2)). Una unidad de actividad hidrolítica de pN-alfa-XP se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1
10 μmol de *p*-nitrofenol por minuto. Se cuantificó la actividad alfa-xilosidasa a partir de 50 μl de los sobrenadantes de cultivo de cada transformante, con 100 mg/l de pN-alfa-XP, durante 10 minutos a 50 °C y en un volumen final de 100 μl . La reacción se detuvo añadiendo 100 μl de carbonato sódico 1 M a las mezclas de reacción. La actividad hidrolítica se midió por la liberación de *p*-nitrofenol (y el consecuente aumento de A_{410}).

15

Los resultados de actividad alfa-xilosidasa se muestran en la figura 3. Los transformantes que mostraron la mayor actividad alfa-xilosidasa se confirmaron en una segunda ronda de ensayo en MTPs (como se describe en US7794962B2) y posteriormente a partir de una fermentación en matraz (Verdoes y col., 2007, *Ind. Biotechnol.* 3 (1); Visser y col., 2011, *Ind. Biotechnol.* 7 (3)). Se confirmó una actividad alfa-xilosidasa superior en comparación con el control en todos ellos.

Ejemplo 3. Determinación de la actividad específica alfa-xilosidasa sobre xiloglucano en las mezclas enzimáticas control y AtAxl.

25

La producción de las mezclas enzimáticas se realizó como se describe en Verdoes y col., 2007, *Ind. Biotechnol.* 3 (1), y Visser y col., 2011, *Ind. Biotechnol.*, 7 (3), utilizando la plataforma industrial para la expresión de enzimas basada en *M. thermophila* C1 y desarrollada por Dyadic Netherlands.

30

Se produjeron dos mezclas enzimáticas diferentes usando estos procedimientos: una mezcla control, que consistía en el cóctel de enzimas secretadas por la cepa C1 de *M.*

thermophila, y la mezcla AtAxl, que consistía de forma análoga en el cóctel de enzimas secretadas por la cepa de *M. thermophila* que expresaba el gen *ataxl*.

La actividad específica alfa-xilosidasa en estas mezclas enzimáticas se determinó usando 5 un heptasacárido de xiloglucano (Megazyme Ref. 20508) como sustrato. Las mezclas de reacción que contenían, en un volumen de reacción de 0,5 ml, 0,05 mmol de tampón acetato sódico (pH 5,0), 0,5 mg de sustrato y 0,3 g de proteína total de cada mezcla enzimática (medida por el Método BCA, producto Applichem A7787 0500), se incubaron durante 10 min a 50 °C. Las reacciones control se realizaron en ausencia de sustrato o de mezcla 10 enzimática. La reacción se detuvo por la adición de 0,5 ml de una solución acuosa filtrada de azida sódica (0,007 g/l) y ácido sulfúrico (0,274 g/l) por la que el pH se ajustó a 2.0. La actividad se determinó midiendo la producción de xilosa en las mezclas de reacción por HPLC (Agilent Technologies, 1200 Series) usando un Detector de Índice de Refracción (DIR) y una columna Aminex HPX-87 H. El sistema se operó a 65 °C y con un caudal de 6 15 ml min⁻¹ de H₂SO₄ 5 mM para la elución del producto. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima responsable de la producción de 1 μmol de xilosa por minuto.

Los resultados se muestran en la figura 4. Se determinó que la actividad específica alfa-xilosidasa era casi indetectable en la mezcla control (también en las reacciones control en 20 ausencia de enzima o sustrato), mientras que alcanzaba 75 U/mg prot. en la mezcla AtAxl.

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora de *Myceliophthora thermophila* que expresa una alfa-xilosidasa.
- 5 2. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la alfa-xilosidasa comprende una secuencia aminoacídica que es al menos un 76% idéntica a la SEQ ID NO: 2.
3. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la alfa-xilosidasa se
10 obtiene a partir de un microorganismo del género *Aspergillus*.
4. La célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que la alfa-xilosidasa comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2.
- 15 5. La célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha célula hospedadora es la cepa C1 de *Myceliophthora thermophila*.
6. Una composición que comprende la célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
20
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende adicionalmente otras enzimas celulolíticas.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las otras enzimas
25 celulolíticas se seleccionan de la lista que consiste en: endoglucanasas, beta-glicosidasas, celobiohidrolasas, beta-xilosidasas, endoxilanasas, endoxiloglucanasas o cualquier combinación de las mismas.
9. Uso de la célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o
30 de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para la degradación de biomasa.

10. Uso, de acuerdo con la reivindicación 9, para la degradación de biomasa en un proceso de producción de un bioproducto.

11. Uso, de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el bioproducto es bioetanol.

5

12. Un procedimiento de producción de azúcares fermentables que comprende:

a) Incubar biomasa con la célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o con la composición de acuerdo con cualquiera de las
10 reivindicaciones 6 a 8, y

b) Recuperar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación en la etapa (a).

13. Un procedimiento de producción de un bioproducto a partir de biomasa que comprende:

15

a. Incubar biomasa con la célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o con la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para provocar la hidrólisis enzimática de dicha biomasa,

b. Fermentar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la
20 etapa (a) con al menos un microorganismo fermentador, y

c. Recuperar el bioproducto obtenido después de la fermentación en la etapa (b).

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el bioproducto es bioetanol.

Figura 1

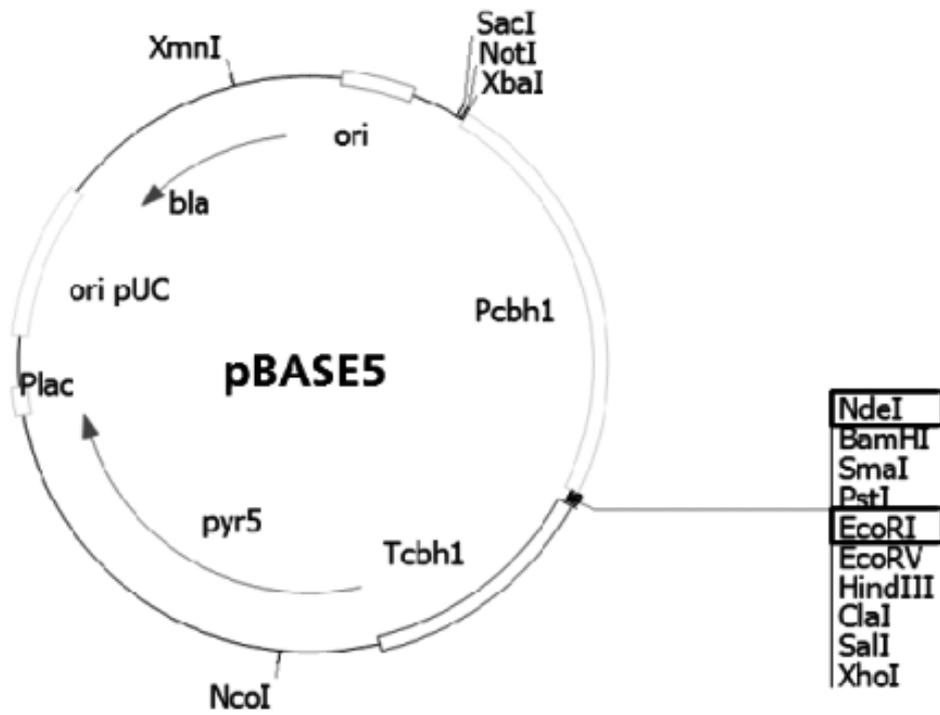


Figura 2

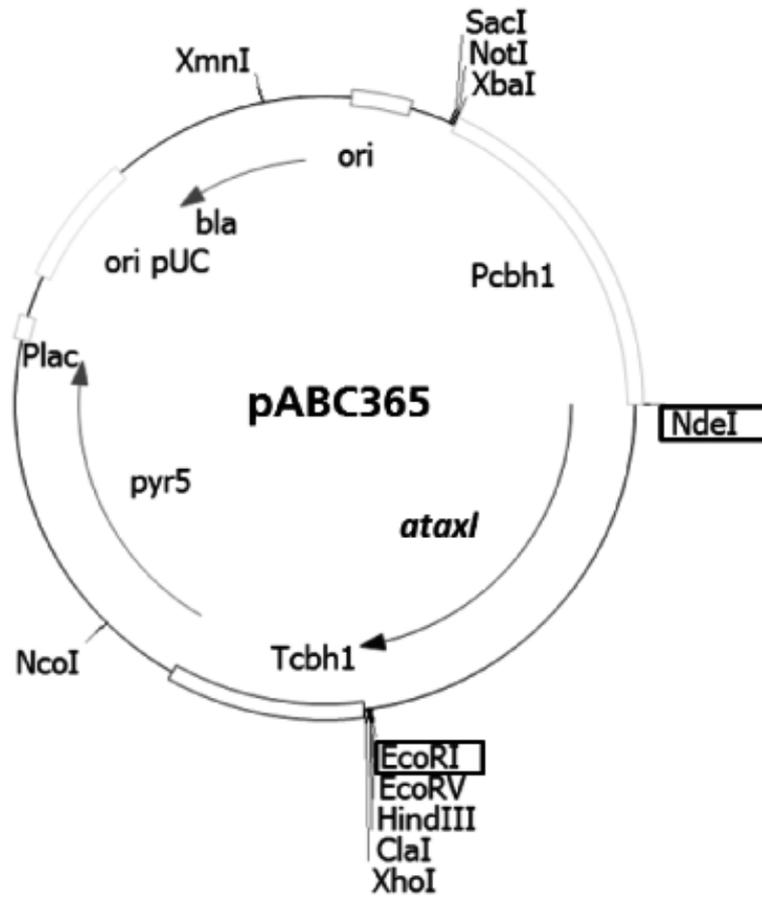


Figura 3

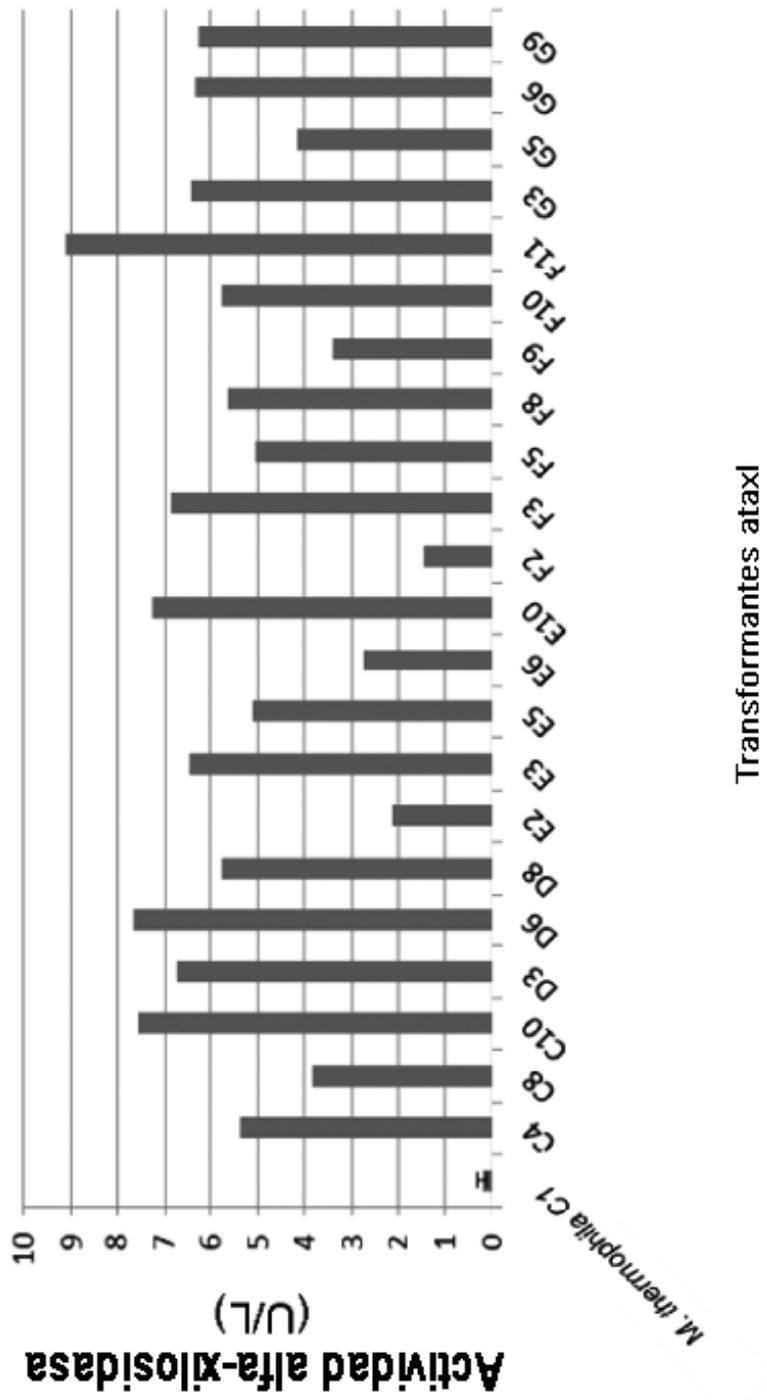
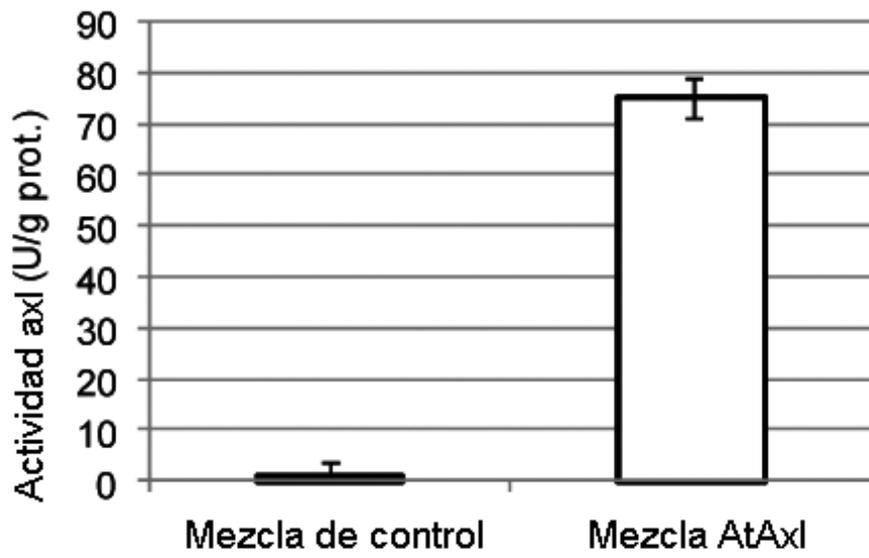


Figura 4



ES 2 527 368 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías, S.A.

<120> "CÉLULA HOSPEDADORA DE MYCELIOPHTHORA THERMOPHILA QUE EXPRESA UNA ENZIMA ALFA-XILOSIDASA HETERÓLOGA Y SU USO EN UN PROCEDIMIENTO DE DEGRADACIÓN DE BIOMASA"

<130> ES1861.29

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2238

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica codificante para el polipéptido de SEQ ID NO: 3

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(54)

<400> 1

```
atgtatcgct ggttggtggc tctggcggcc tgcgctgggc agctggccct ggcaaacccc      60
gttacccgc gagataccga ctacttcaag cccaattcca caggctttcg catgcgccac      120
ggtttcgaaa cggtcctggt gcagcccttt gggtagcagc ggttccgcgt gcgcgctgg      180
cctttccggc cgccgacggg gcaggagctg agcttcgtgt atgaccccc tctcgaaggc      240
tttgaagatg gtcaagcgca tggatggac tacgacacgg ctttaccgg caacgagtcc      300
ctggccattc gcaacgggaa catgatcgtg cgcacgaccg gctgggggtg caaccccggc      360
gggatcgcac tggcgttcta ccgctgggaa gaagatgggt ccgagaccct tctaccaaac      420
gagtatgcac cgctcaaadc cgtgaacccg cgatactact cgtggaacgg ccctggcgcc      480
gagttctccg ccgagttcac cttcagcacc acgcccgcag agcagttcta cggcactggc      540
acgcagcagg accacctggt caacaagaaa ggcaccgtca ttgacctgat caacttcaac      600
acgcacatcc ccacccccgt gttcatgagc aacaagggct acggcttcgt gtggaacatg      660
gcgtccgagg gccgcatgga gttcggccag ctgcgcaaca aattcaccgc agcgtcggcc      720
accctggtcg actacgtgat tgtcgcttcg cccgcaggcg actacgacac tctgcagcag      780
cgtctgtccg ccctgaccgg gcgtgctccg acaccaccg acttcgctct tggctacatc      840
cagtccaagc tgcggtacga gaaccagacc gaggtcgagc tgctggccca gaacttcaaa      900
gaccacaaca tccccgctcg catgatcgtc atcgactacc agtcgtgggc agaccagggc      960
gactgggagc tcgacccgcg cctctggcca gacgtcgccg cgatggcacg caaagtaaaa     1020
gagctgaccg gcgaggagat gatggcatcg ctgtggccga gcgtgtccga cgacagcgtc     1080
aactacgagg ccctgcagat gaatgggtgg ctgacggcga cgcgacgagc accgggcacc     1140
accgactcct ggaacggctc gtacatccgc aacatcgact cgacgaacc ggacgcgcgc     1200
cgcttcctct gggacaccct caaacgcaac tactacgaca agggcatccg gaacttctgg     1260
```

ES 2 527 368 A1

atcgaccagg cgcacggcgg cgcctcggc gaggcctacg agaacaacgg ccagtcctcg 1320
 tacatccagt ccatcccgta cgcgctgccg aacgtgctct acgccgcggg cacgcagctc 1380
 ggcgtcggga agatgtaccc ctggacgcac cagatggcga tcgacgaggg cttccgcaac 1440
 gccacggact cgaaacctgg ttccgcgtgc gagcacatct cgctcagccg gtcgggatac 1500
 atcggctcgc agcggttttg cagcatgatc tgggccggtg acatcacctc cgtctgggag 1560
 acgctgggcc tgcaggtggc tagcgggctg tcggccgcgg cgacaggctg gggctggtgg 1620
 accgtcgacg cgggcggggt ccagcctgat cccacgggtgc cgtggagcgc gaacatcgac 1680
 acgcccagat accgcgagtt gtacgtgcgc tggctgcagt ggacgacgtt tttgccgttt 1740
 atcgggacgc acgggagccg cgagtgcgac agccaaaacg catacacctg caacaacgag 1800
 ccgtggtcgt atggcgagga gaatacggc gtcacgtgtg cgtatatcca tctgcggtat 1860
 caacttggtg cgtatctgcg cgcgatcttc aagaagtcc atgagaccgg tcgcagcatc 1920
 atcgggccgt tgtatatgga tttcagaag acggaccgc ggattcggac tatgaccag 1980
 gcgaacacga acgtcactac ccagcagtac atgttcggtc cgcgtttgct ggtctccccg 2040
 gtgactacgc ccaacacgac cgagtggcca gtgtatctgc cccagacggg ccagaatggc 2100
 accaagccgt ggacgtactg gtggacgaat gagacgtatg cccggggggca gacggtgaag 2160
 gtccctgcgc cggtggagca tattccggtg ttccatctag gtacgagaga ggagatattg 2220
 tctggagatg ttttttaa 2238

<210> 2
 <211> 727
 <212> PRT
 <213> Aspergillus terreus

<400> 2

Asn Pro Val His Pro Arg Asp Thr Asp Tyr Phe Lys Pro Asn Ser Thr
 1 5 10 15

Gly Phe Arg Met Arg His Gly Phe Glu Thr Val Leu Val Gln Pro Phe
 20 25 30

Gly Tyr Asp Gly Phe Arg Val Arg Ala Trp Pro Phe Arg Pro Pro Thr
 35 40 45

Gly Gln Glu Leu Ser Phe Val Tyr Asp Pro Pro Leu Glu Gly Phe Glu
 50 55 60

Asp Gly Gln Ala His Gly Met Asp Tyr Asp Thr Ala Phe Thr Gly Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Leu Ala Ile Arg Asn Gly Asn Met Ile Val Arg Thr Thr Gly
 85 90 95

Trp Gly Gly Asn Pro Gly Gly Tyr Arg Leu Ala Phe Tyr Arg Val Glu
 100 105 110

ES 2 527 368 A1

Glu Asp Gly Ser Glu Thr Leu Leu Thr Asn Glu Tyr Ala Pro Leu Lys
 115 120 125
 Ser Val Asn Pro Arg Tyr Tyr Ser Trp Asn Gly Pro Gly Ala Glu Phe
 130 135 140
 Ser Ala Glu Phe Thr Phe Ser Thr Thr Pro Asp Glu Gln Phe Tyr Gly
 145 150 155 160
 Thr Gly Thr Gln Gln Asp His Leu Val Asn Lys Lys Gly Thr Val Ile
 165 170 175
 Asp Leu Ile Asn Phe Asn Thr His Ile Pro Thr Pro Val Phe Met Ser
 180 185 190
 Asn Lys Gly Tyr Gly Phe Val Trp Asn Met Ala Ser Glu Gly Arg Met
 195 200 205
 Glu Phe Gly Gln Leu Arg Asn Lys Phe Thr Ala Ala Ser Ala Thr Leu
 210 215 220
 Val Asp Tyr Val Ile Val Ala Ser Pro Ala Gly Asp Tyr Asp Thr Leu
 225 230 235 240
 Gln Gln Arg Leu Ser Ala Leu Thr Gly Arg Ala Pro Thr Pro Pro Asp
 245 250 255
 Phe Ala Leu Gly Tyr Ile Gln Ser Lys Leu Arg Tyr Glu Asn Gln Thr
 260 265 270
 Glu Val Glu Leu Leu Ala Gln Asn Phe Lys Asp His Asn Ile Pro Val
 275 280 285
 Gly Met Ile Val Ile Asp Tyr Gln Ser Trp Ala Asp Gln Gly Asp Trp
 290 295 300
 Ala Leu Asp Pro Arg Leu Trp Pro Asp Val Ala Ala Met Ala Arg Lys
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Leu Thr Gly Ala Glu Met Met Ala Ser Leu Trp Pro Ser
 325 330 335
 Val Ser Asp Asp Ser Val Asn Tyr Glu Ala Leu Gln Met Asn Gly Trp
 340 345 350
 Leu Thr Ala Thr Arg Asp Gly Pro Gly Thr Thr Asp Ser Trp Asn Gly
 355 360 365
 Ser Tyr Ile Arg Asn Ile Asp Ser Thr Asn Pro Asp Ala Arg Arg Phe
 370 375 380

ES 2 527 368 A1

Leu Trp Asp Thr Leu Lys Arg Asn Tyr Tyr Asp Lys Gly Ile Arg Asn
 385 390 395 400
 Phe Trp Ile Asp Gln Ala Asp Gly Gly Ala Leu Gly Glu Ala Tyr Glu
 405 410 415
 Asn Asn Gly Gln Ser Leu Tyr Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Ala Leu Pro
 420 425 430
 Asn Val Leu Tyr Ala Ala Gly Thr Gln Leu Gly Val Gly Lys Met Tyr
 435 440 445
 Pro Trp Thr His Gln Met Ala Ile Asp Glu Gly Phe Arg Asn Ala Thr
 450 455 460
 Asp Ser Lys Pro Gly Ser Ala Cys Glu His Ile Ser Leu Ser Arg Ser
 465 470 475 480
 Gly Tyr Ile Gly Ser Gln Arg Phe Cys Ser Met Ile Trp Ser Gly Asp
 485 490 495
 Ile Thr Ser Val Trp Glu Thr Leu Gly Leu Gln Val Ala Ser Gly Leu
 500 505 510
 Ser Ala Ala Ala Thr Gly Trp Gly Trp Trp Thr Val Asp Ala Gly Gly
 515 520 525
 Phe Gln Pro Asp Pro Thr Val Pro Trp Ser Ala Asn Ile Asp Thr Pro
 530 535 540
 Glu Tyr Arg Glu Leu Tyr Val Arg Trp Leu Gln Trp Thr Thr Phe Leu
 545 550 555 560
 Pro Phe Met Arg Thr His Gly Ser Arg Glu Cys Asp Ser Gln Asn Ala
 565 570 575
 Tyr Thr Cys Asn Asn Glu Pro Trp Ser Tyr Gly Glu Glu Asn Thr Pro
 580 585 590
 Val Ile Val Ser Tyr Ile His Leu Arg Tyr Gln Leu Gly Ala Tyr Leu
 595 600 605
 Arg Ala Ile Phe Lys Lys Phe His Glu Thr Gly Arg Ser Ile Met Arg
 610 615 620
 Pro Leu Tyr Met Asp Phe Glu Lys Thr Asp Pro Arg Ile Arg Thr Met
 625 630 635 640
 Thr Gln Ala Asn Thr Asn Val Thr Thr Gln Gln Tyr Met Phe Gly Pro
 645 650 655

ES 2 527 368 A1

Arg Leu Leu Val Ser Pro Val Thr Thr Pro Asn Thr Thr Glu Trp Pro
660 665 670

Val Tyr Leu Pro Gln Thr Gly Gln Asn Gly Thr Lys Pro Trp Thr Tyr
675 680 685

Trp Trp Thr Asn Glu Thr Tyr Ala Gly Gly Gln Thr Val Lys Val Pro
690 695 700

Ala Pro Val Glu His Ile Pro Val Phe His Leu Gly Thr Arg Glu Glu
705 710 715 720

Ile Leu Ser Gly Asp Val Phe
725

<210> 3
<211> 745
<212> PRT
<213> Aspergillus terreus

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1)..(18)

<400> 3

Met Tyr Arg Trp Leu Val Ala Leu Ala Ala Cys Ala Gly Gln Leu Ala
1 5 10 15

Leu Ala Asn Pro Val His Pro Arg Asp Thr Asp Tyr Phe Lys Pro Asn
20 25 30

Ser Thr Gly Phe Arg Met Arg His Gly Phe Glu Thr Val Leu Val Gln
35 40 45

Pro Phe Gly Tyr Asp Gly Phe Arg Val Arg Ala Trp Pro Phe Arg Pro
50 55 60

Pro Thr Gly Gln Glu Leu Ser Phe Val Tyr Asp Pro Pro Leu Glu Gly
65 70 75 80

Phe Glu Asp Gly Gln Ala His Gly Met Asp Tyr Asp Thr Ala Phe Thr
85 90 95

Gly Asn Glu Ser Leu Ala Ile Arg Asn Gly Asn Met Ile Val Arg Thr
100 105 110

Thr Gly Trp Gly Gly Asn Pro Gly Gly Tyr Arg Leu Ala Phe Tyr Arg
115 120 125

Val Glu Glu Asp Gly Ser Glu Thr Leu Leu Thr Asn Glu Tyr Ala Pro
130 135 140

Leu Lys Ser Val Asn Pro Arg Tyr Tyr Ser Trp Asn Gly Pro Gly Ala
5

ES 2 527 368 A1

Tyr Glu Asn Asn Gly Gln Ser Leu Tyr Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Ala
 435 440 445
 Leu Pro Asn Val Leu Tyr Ala Ala Gly Thr Gln Leu Gly Val Gly Lys
 450 455 460
 Met Tyr Pro Trp Thr His Gln Met Ala Ile Asp Glu Gly Phe Arg Asn
 465 470 475 480
 Ala Thr Asp Ser Lys Pro Gly Ser Ala Cys Glu His Ile Ser Leu Ser
 485 490
 Arg Ser Gly Tyr Ile Gly Ser Gln Arg Phe Cys Ser Met Ile Trp Ser
 500 505 510
 Gly Asp Ile Thr Ser Val Trp Glu Thr Leu Gly Leu Gln Val Ala Ser
 515 520 525
 Gly Leu Ser Ala Ala Ala Thr Gly Trp Gly Trp Trp Thr Val Asp Ala
 530 535 540
 Gly Gly Phe Gln Pro Asp Pro Thr Val Pro Trp Ser Ala Asn Ile Asp
 545 550 555 560 565
 Thr Pro Glu Tyr Arg Glu Leu Tyr Val Arg Trp Leu Gln Trp Thr Thr
 565 570 575
 Phe Leu Pro Phe Met Arg Thr His Gly Ser Arg Glu Cys Asp Ser Gln
 580 585 590
 Asn Ala Tyr Thr Cys Asn Asn Glu Pro Trp Ser Tyr Gly Glu Glu Asn
 595 600 605
 Thr Pro Val Ile Val Ser Tyr Ile His Leu Arg Tyr Gln Leu Gly Ala
 610 615 620
 Tyr Leu Arg Ala Ile Phe Lys Lys Phe His Glu Thr Gly Arg Ser Ile
 625 630 635 640
 Met Arg Pro Leu Tyr Met Asp Phe Glu Lys Thr Asp Pro Arg Ile Arg
 645 650 655
 Thr Met Thr Gln Ala Asn Thr Asn Val Thr Thr Gln Gln Tyr Met Phe
 660 665 670
 Gly Pro Arg Leu Leu Val Ser Pro Val Thr Thr Pro Asn Thr Thr Glu
 675 680 685
 Trp Pro Val Tyr Leu Pro Gln Thr Gly Gln Asn Gly Thr Lys Pro Trp
 690 695 700

ES 2 527 368 A1

Thr Tyr Trp Trp Thr Asn Glu Thr Tyr Ala Gly Gly Gln Thr Val Lys
705 710 715 720

Val Pro Ala Pro Val Glu His Ile Pro Val Phe His Leu Gly Thr Arg
725 730 735

Glu Glu Ile Leu Ser Gly Asp Val Phe
740 745



- ②① N.º solicitud: 201331109
②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.07.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | WO 0020555 A2 (AARL, INC) 13.04.2000, todo el documento, especialmente reivindicaciones. | 1-14 |
| X | VISSER, H. et al. "Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a <i>Myceliophthora thermophila</i> isolate, previously known as <i>Chrysosporium lucknowense</i> C1". INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY. Junio 2011, Vol. 7, N° 3, páginas 214-223, todo el documento. | 1,2,5-14 |
| Y | | 3,4 |
| X | HINZ, S.W.A. et al. "Hemicellulase production in <i>Chrysosporium lucknowense</i> C1". JOURNAL OF CEREAL SCIENCE". Noviembre 2009. Vol. 50, N° 3, páginas 318-323, todo el documento. | 1,2,5-14 |
| Y | | 3,4 |
| X | BERKA, R.M. et al. "Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi <i>Myceliophthora thermophila</i> and <i>Thielavia terrestris</i> ". NATURE BIOTECHNOLOGY. 02.10.2011. Vol. 29, N° 10, páginas 922-927. Ver información adicional, Fig. 3. GH31. | 1,2,5-14 |
| Y | BIRREN, B.W. et al. "Annotation of the <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 genome.". 17.10.2006. BASE DE DATOS UniProt [en línea], [recuperado el 03.12.2014], n° de acceso Q0CD44_ASPTN. Recuperado de internet http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?uniprot:Q0CD44_ASPTN , secuencia. | 3,4 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
29.12.2014

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/15 (2006.01)

C12N9/24 (2006.01)

C12P7/10 (2006.01)

C12P19/14 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.12.2014

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-14 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-14 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en la cepa del hongo ascomiceto *Myceliophthora thermophila* C1, previamente denominado *Chrysosporium lucknowense* C1, que expresa la α -xilosidasa de *Aspergillus terreus* NIH 2624 de SEQ ID nº 2. La cepa se utiliza para degradar biomasa en procesos de obtención de bioetanol.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | WO 0020555 A2 (AARL, INC) | 13.04.2000 |
| D02 | VISSER, H. et al. "Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a <i>Myceliophthora thermophila</i> isolate, previously known as <i>Chrysosporium lucknowense</i> C1". INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY. Junio 2011, Vol. 7, Nº 3, páginas 214-223. | |
| D03 | HINZ, S.W.A. et al. "Hemicellulase production in <i>Chrysosporium lucknowense</i> C1". JOURNAL OF CEREAL SCIENCE". Noviembre 2009. Vol. 50, Nº 3, páginas 318-323. | |
| D04 | BERKA, R.M. et al. "Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi <i>Myceliophthora thermophila</i> and <i>Thielavia terrestris</i> ". NATURE BIOTECHNOLOGY. 02.10.2011. Vol. 29, Nº 10, páginas 922-927. Ver información adicional, Fig. 3. GH31. | |
| D05 | BIRREN, B.W. et al. "Annotation of the <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 genome.". 17.10.2006. BASE DE DATOS UniProt [en línea], [recuperado el 03.12.2014], nº de acceso Q0CD44_ASPTN. http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?uniprot:Q0CD44_ASPTN . | |

El documento D01, describe la cepa *Myceliophthora thermophila* C1, como un sistema de transformación para expresar y obtener proteínas heterólogas. El documento reivindica los mutantes de *Myceliophthora thermophila* C1 que expresan proteínas de distintos orígenes, incluyendo las enzimas implicadas en la degradación de carbohidratos.

El documento D02, describe la historia taxonómica de la cepa *Myceliophthora thermophila* C1, su uso como fuente para producir enzimas hidrolíticas útiles en procesos de obtención de bioetanol y su uso para obtener proteínas heterólogas.

El documento D03, Describe la producción de hemicelulasas de la cepa *Chrysosporium lucknowense* C1. Menciona que el genoma está totalmente secuenciado aunque no ha sido publicado. El artículo menciona el uso de la cepa en procedimientos de obtención de bioetanol.

El documento D04, presenta un análisis genómico comparativo entre los genomas de los hongos que degradan biomasa *Myceliophthora thermophila* y *Thielavia terrestris*. Se menciona que el genoma de *Myceliophthora thermophila* ha sido secuenciado en su totalidad y en la Tabla suplementaria 3, se identifica la presencia de alguna hipotética p roteína α de la familia GH31 a la que pertenecen las α -xilosidasas.

El documento D05, contiene la información sobre la secuencia de la α -xilosidasa de *Aspergillus terreus* NIH 2624 de SEQ ID nº 2, que los solicitantes han expresado en el sistema de transformación descrito en el documento D01.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA****Reivindicaciones 1-14**

La cepa *Myceliophthora thermophila* C1, como un sistema de transformación para expresar y obtener proteínas heterólogas y los mutantes derivados de la misma, que incluyen la información genética para obtenerlas, han sido descritos en el documento D01. Entre las posibles proteínas heterólogas, se describe en el documento la obtención de las enzimas implicadas en la degradación de biomasa que se utilizan en los procesos de obtención de biocombustibles. Los documentos D02-D04, presentan información adicional sobre la cepa *Myceliophthora thermophila* C1 y su uso en procesos de degradación de biomasa.

Los mutantes derivados de *Myceliophthora thermophila* C1 que expresan proteínas heterólogas que se utilizan en los procesos de degradación de biomasa implicados en la obtención de bioetanol, no son nuevos y no tienen actividad inventiva. Las reivindicaciones 1-14, no cumplen los requisitos de los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.