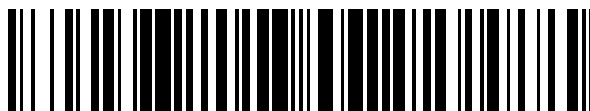


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 805**

51 Int. Cl.:

C07K 14/37 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 14/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010** **E 10763938 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015** **EP 2483295**

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

30 Prioridad:

29.09.2009 US 246893 P

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

22.02.2016

73 Titular/es:

NOVOZYMES INC. (50.0%)

1445 Drew Avenue

Davis, CA 95618, US y

NOVOZYMES A/S (50.0%)

72 Inventor/es:

TANG, LAN;

LIU, YE;

DUAN, JUNXIN;

YU, ZHANG;

JORGENSEN, CHRISTIAN y

KRAMER, RANDALL

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 560 805 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 mejoradora celulolítica y polinucleótidos que los codifican

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad mejoradora celulolítica y polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos.
La invención también se refiere a métodos de producir polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la invención y utilizar los polipéptidos en métodos de degradar o convertir o material celulósico.
Finalmente la invención se refiere a métodos para producir un producto de fermentación y composiciones detergentes.

15 Descripción de las técnicas relacionadas

[0002] Celulosa es un polímero de la glucosa de azúcar simple enlazada por enlaces beta-1,4 .
Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos beta-enlazados.
20 Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas.
Endoglucanasas asimilan el polímero de celulosa en ubicaciones al azar, abriéndolo a ataque por celobiohidrolasas.
Celobiohidrolasas consecutivamente liberan moléculas de celobiosa de las extremidades del polímero de celulosa.
Celobiosa es un hidrosoluble dímero de glucosa enlazado beta-1,4.
Beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa a glucosa.

25 [0003] La conversión de materias primas lignocelulósicas en el etanol tiene las ventajas de la disponibilidad listo de cantidades grandes de materia prima, la conveniencia de evitar quemar o verter los materiales, y la limpieza del combustible de etanol.
Madera, residuos agrícolas, plantas de cultivo herbáceas, y desperdicios sólidos municipales han sido considerados
30 como materias primas para producción de etanol.
Estos materiales principalmente consisten en celulosa, hemicelulosa, y lignina.
Una vez la celulosa se convierte en glucosa, la glucosa es fácilmente fermentada por levadura en el etanol.

35 [0004] Sería ventajoso en la técnica mejorar la capacidad para enzimáticamente degradar materias primas lignocelulósicas.

[0005] WO 2005/074647 revelan polipéptidos aislados con actividad mejoradora celulolítica y sus polinucleótidos de *Thielavia terrestris*.
WO 2005/074656 divulga un polipéptido aislado con actividad mejoradora celulolítica y su polinucleótido de
40 *Thermoascus aurantiacus*.
WO 2007/089290 divulga un polipéptido aislado con actividad mejoradora celulolítica y su polinucleótido de *Trichoderma reesei*.
US 2008/299613 divulga una composición de proteína celulolítica que comprende un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica derivada de *Thielavia terrestris*.

45 [0006] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

Resumen de la invención

50 [0007] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad mejoradora celulolítica seleccionados del grupo consistente en:

- (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos 80% identidad al polipéptido maduro de SEC ID n°: 2;
- 55 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 80% identidad a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1.

[0008] La presente invención también se refiere a polipéptidos de codificación de polinucleótidos aislados con actividad mejoradora celulolítica de la invención.

60 [0009] La presente invención también se refiere a métodos de producción de los polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica de la invención.

65 [0010] La presente invención también se refiere a métodos para degradar o convertir un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención.

En un aspecto preferido, el método comprende además recuperación del material celulósico degradado o convertido.

[0011] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un producto de fermentación, que comprende: (a) sacarificación de un material celulósico con una composición enzimática en la presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención; (b) fermentación del material celulósico sacarificado con uno o más microorganismos de fermentación para producir el producto de fermentación; y (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

[0012] La presente invención también se refiere a métodos de fermentación de un material celulósico, que comprenden: fermentación del material celulósico con uno o varios microorganismos de fermentación, donde el material celulósico se sacarifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención.

En un aspecto preferido, la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación.

En un aspecto, el método comprende además recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

Breve descripción de las figuras

[0013]

La Figura 1 muestra un mapa de pGH61D23Y4.

La Figura 2 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de un gen que codifica un *Penicillium* sp. Polipéptido GH61A con actividad mejoradora celulolítica (SEC ID NOs: 1 y 2, respectivamente).

La Figura 3 muestra hidrólisis vs. concentración de *Penicillium* adicionado sp. polipéptido GH61A con actividad mejoradora celulolítica.

Definiciones

[0014] Polipéptido con actividad mejoradora celulolítica: El término "polipéptido con actividad mejoradora celulolítica" significa un polipéptido GH61 que realiza la hidrólisis de un material celulósico por enzima con actividad celulolítica.

Para fines de la presente invención, actividad mejoradora celulolítica se determina por medición del aumento en azúcares reductores o el aumento del total de celobiosa y glucosa de la hidrólisis de un material celulósico por enzima celulolítica bajo las siguientes condiciones: 1-50 mg de total proteína/g de celulosa en PCS, donde proteína está compuesta de 50-99,5% p/p proteína enzimática celulolítica y 0,5-50% p/p proteína de un polipéptido GH61 con actividad mejoradora celulolítica durante 1-7 días a 50°C en comparación con una hidrólisis de control con igual carga de proteína sin actividad mejoradora celulolítica (1-50 mg de celulolítico proteína/g de celulosa en PCS).

En un aspecto preferido, una mezcla de CELLULAST® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) en presencia de 2-3% de peso de proteína beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (de recombinación producida en el *Aspergillus oryzae* según WO 02/095014) o 2-3% de peso de proteína beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (de recombinación producida en el *Aspergillus oryzae* como se describe en WO 2002/095014) de carga de proteína de celulasas se usa como la fuente de la actividad celulolítica.

[0015] Los polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, de forma más preferible al menos 50%, de forma más preferible al menos 60%, de forma más preferible al menos 70%, de forma más preferible al menos 80%, incluso de forma más preferible al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, y de la forma incluso más preferible al menos 100% de la actividad mejoradora celulolítica del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2.

[0016] Los polipéptidos GH61 con actividad mejoradora celulolítica mejoran la hidrólisis de un material celulósico catalizado por enzima con actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis preferiblemente al menos 1,01 veces, de forma más preferible al menos 1,05 veces, de forma más preferible al menos 1,10 veces, de forma más preferible al menos 1,25 veces, de forma más preferible al menos 1,5 veces, de forma más preferible al menos 2 veces, de forma más preferible al menos 3 veces, de forma más preferible al menos 4 veces, de forma más preferible al menos 5 veces, incluso de forma más preferible al menos 10 veces, y de la forma más preferible al menos 20 veces.

[0017] Glicósido hidrolasa de familia 61: el término "glicósido hidrolasa de familia 61" o "familia GH61" es definido aquí a un polipéptido decreciente en la familia glicósido hidrolasa 61 según Henrissat B., 1991, una clasificación de glicosil hidrolasas basada en similitudes de secuencia de aminoácidos, Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat B., and Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0018] Enzima celulolítica o celulasas: el término "celulasas" o "enzima celulolítica" significa una o más (diferentes) enzimas que hidrolizan un material celulósico.

Tales enzimas incluyen endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s), beta-glucosidasa(s), o combinaciones de las mismas. Los dos métodos básicos para medir actividad celulolítica incluyen: (1) medir la actividad celulolítica total, y (2) medir las actividades celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas, y glucosidasas beta) como revisadas

en Zhang et al., Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481.

Actividad celulolítica total se mide usando sustratos insolubles, incluyendo Whatman N°1 papel de filtro, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa algal, algodón, lignocelulosa pretratada, etc. El ensayo de actividad celulolítica total más común es el ensayo de papel de filtro usando Whatman N°1 papel de filtro como el sustrato. El ensayo fue establecido por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

[0019] Para fines de la presente invención, actividad enzimática celulolítica se determina por medición del aumento en la hidrólisis de un material celulósico por enzima(s) celulolítica bajo las siguientes condiciones: 1-20 mg de proteína enzimática celulolítica/g de celulosa en PCS durante 3-7 días a 50°C en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína enzimática celulolítica.

Condiciones típicas son reacciones 1 ml, PCS lavados o sin lavar, 5% sólidos insolubles, 50 mM acetato sódico pH 5,1 mM MnSO₄, 50°C, 72 horas, análisis de azúcar por AMINEX® HPX-87H columna (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU).

[0020] Endoglucanasa: el término "endoglucanasa" es definida aquí como una endo-1,4-(1,3,1,4)- beta-D-glucan 4-glucanohidrolasa (E.C. 3,2,1,4), que cataliza endohidrólisis de 1,4-beta-D enlaces glicosídicos en la celulosa, derivados químicos de la celulosa (tales como carboximetilcelulosa y celulosa de hidroxietilo), liquenina, beta-1,4 enlaces en mezclas beta-1,3 glucanos tal como cereal beta-D- glucanos o xiloglucanos, y otro material vegetal que contenga componentes celulósicos.

Actividad de endoglucanasa se puede determinar basada en reducción en la viscosidad de sustrato o aumento en las extremidades de reducción determinada por un ensayo de azúcar reductor (Zhang et al., 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481).

Para fines de la presente invención, actividad de endoglucanasa es determinada usando la hidrólisis carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268.

[0021] Celobiohidrolasa: el término "celobiohidrolasa" es definido aquí como una 1,4-beta-D celobiohidrolasa de glucano (E.C. 3,2,1,91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier glucosa enlazada beta-1,4 que contenga polímero, liberando celobiosa de las extremidades reductoras o no reductoras de la cadena (Teeri, 1997, Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology 15: 160-167 ; Teeri et al., 1998, Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178).

Para fines de la presente invención, actividad de celobiohidrolasa se determina en un derivado de disacárido fluorescente 4-methylumbelliferyl-β-D-lactoside según los procedimientos descrito por van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156 and van Tilbeurgh and Claeysens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288 .

[0022] Beta-glucosidasa: el término "beta-glucosidasa" es definido aquí como una beta-D- glucosidasa de glucósido (E.C. 3,2,1,21), que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa terminal no-reducida con la liberación de beta-D-glucosa.

Para fines de la presente invención, actividad de beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi et al., 2002, Extracellular beta-D-glucosidasa from Chaetomium thermophilum var. coprophilum: production, purification and some biochemical properties, J. Basic Microbiol. 42: 55-66, excepto que condiciones diferentes fueron empleadas como se describe en este caso.

Una unidad de actividad de beta-glucosidasa es definida como 1,0 μmol de p-nitrofenol producido por minuto a 40°C, pH 5 de 1 mM p-nitrophenyl-beta-D glucopiranosido como sustrato en 100 mM citrato sódico pH 5 que contiene 0,01% TWEEN® 20.

[0023] Actividad de degradación de xilano: los términos "actividad de degradación de xilano" o "actividad xilanolítica" son definidos aquí como una actividad biológica que hidroliza material que contiene xilano.

Los dos métodos básicos para medir actividad xilanolítica incluyen: (1) medir la actividad xilanolítica total, y (2) medir las actividades xilanolíticas individuales (endoxilasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, esterasas de xilano de acetilo, esterasas de ácido ferúlico, y esterasas de alfa-glucuronilo).

Progreso reciente en ensayos de enzimas xilanolíticas se resume en diferentes publicaciones incluyendo Biely and Puchard, Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes, 2006, Journal of the Science of Food and Agriculture 86(11): 1636-1647 ; Spanikova and Biely, 2006, Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by Schizophyllum commune, FEBS Letters 580(19): 4597-4601 ; y Herrmann, Vrsanska, Jurickova, Hirsch, Biely, and Kubicek, 1997, The beta-D-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase, Biochemical Journal 321: 375-381.

[0024] Actividad de degradación de xilano total se puede medir por determinación de los azúcares reductores formado de tipos varios de xilano, incluyendo xilanos de avena escanda, madera de haya, y madera de alerce, o por determinación fotométrica de fragmentos de xilano teñido liberados de xilanos teñidos varios de manera covalente.

El ensayo de actividad xilanolítica total más común se basa en producción de azúcares reductores de glucuronoxilano de 4-O-metilo polimérico como se describe en Bailey, Biely, Poutanen, 1992, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, Journal of Biotechnology 23(3): 257-270.

[0025] Para fines de la presente invención, actividad de degradación de xilano se determina por medición del aumento en la hidrólisis de xilano de madera de abedul (Sigma Chemical Co., Inc., St. Luis, MO, EE.UU) por enzima(s) de degradando de xilano bajo las siguientes condiciones típicas: reacciones 1 ml, 5 mg/ml sustrato (sólidos totales), 5 mg de proteína xilanolítica/g de sustrato, 50 mM acetato sódico pH 5,50°C, 24 horas, análisis de azúcar que utiliza un ensayo hidrácido de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) como se describe por Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal. Biochem 47: 273- 279 .

[0026] Xilanasa: el término "xilanasa" es definido aquí como una 1,4-beta-D-xilan-xilohidrolasa (E.C. 3,2,1,8) que cataliza la endo-hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.

Para fines de la presente invención, actividad de xilanasa es determinada usando xilano de madera de abedul como sustrato.

Una unidad de actividad de xilanasa es definida como 1,0 μ mol de azúcar reductor (medida en los equivalentes de glucosa como se describe por palanca, 1972, una reacción nueva para determinación colorimétrica de carbohidratos, Anal. Biochem 47: 273-279) producido por minuto durante el periodo inicial de hidrólisis a 50°C, pH 5 de 2 g de xilano de madera de abedul por litro como sustrato en 50 mM acetato sódico pH 5 que contiene 0,01% TWEEN® 20.

[0027] Beta-xilosidasa: el término "beta-xilosidasa" es definido aquí como una xilohidrolasa de beta-D-xilósido (E.C. 3,2,1,37) que cataliza la exohidrólisis de beta (1 $\rightarrow$ 4)- xilooligosacáridos corta, para eliminar residuos D-xilosa sucesivos de los terminales no-reducidos.

Para fines de la presente invención, una unidad de actividad de beta-xilosidasa es definida como 1,0 μ mol ofp-nitrofenol producido por minuto a 40°C, pH 5 de 1 mM p-nitrofenil-beta-D-xiloside como sustrato en 100 mM citrato sódico pH 5 que contiene 0,01% TWEEN® 20.

[0028] Acetilxilano esterasa: el término "acetilxilano esterasa" es definido aquí como una carboxilesterasa (EC 3,1,1,72) que cataliza la hidrólisis de grupos de acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilado, glucosa acetilada, acetato de alfa-naftil, y acetato de p-nitrofenilo.

Para fines de la presente invención, actividad de acetilxilano esterasa es determinada usando el 0,5 mM P- nitrofenil acetato como sustrato en 50 mM acetato sódico pH 5,0 que contiene 0,01% TWEEN™ 20.

Una unidad de actividad de acetilxilano esterasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de anión de p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0029] Feruloil esterasa: el término "feruloil esterasa" es definida aquí como un 4-hidroxi-3- metoxicinamoil-azúcar hidrolasa (EC 3,1,1,73) que cataliza la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en sustratos "naturales", para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato).

Feruloil esterasa es también conocido como esterasa de ácido ferúlico, esterasa de hidroxicinamoil, FAE-III, hidrolasa de éster de cinnamoilo, FAEA, cinnAE, FAE, o FAE.

Para fines de la presente invención, actividad feruloil esterasa es determinada usando el 0,5 mM p-nitrofenilferulato como sustrato en 50 mM acetato sódico pH 5,0.

Una unidad de actividad feruloil esterasa iguala la cantidad de enzima capaz de liberar anión de 1 μ mol de p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0030] Alfa-glucuronidasa: el término "alfa-glucuronidasa" es definido aquí como un alfa-D glucuronohidrolasa de glucosiduronato (EC 3,2,1,139) que cataliza la hidrólisis de un alfa-D glucuronosida a D-glucuronato y un alcohol.

Para fines de la presente invención, actividad de glucuronidasa alfa se determina según de Vries, 1998, J. Bacteriol. 180: 243-249.

Una unidad de actividad de alfa-glucuronidasa iguala la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido glucurónico o ácido 4-O-metilglucurónico por minuto a pH 5, 40°C.

[0031] Alfa-L-arabinofuranosidasa: el término "alfa-L-arabinofuranosidasa" es definido aquí como una arabinofuranohidrolasa de alfa-L-arabinofuranosida (EC 3,2,1,55) que cataliza la hidrólisis de residuos de alfa-L-arabinofuranosida terminal no reductores en alfa-L-arabinósidos.

La actividad enzimática actúa sobre alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contiene enlaces (1,3)- y/o (1,5), arabinoxilanas, y arabinogalactanos.

Alfa-L-arabinofuranosidasa es también conocida como arabinosidasa, alfa-arabinosidasa, alfa-L-arabinosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa polisacárida, hidrolasa de alfa-L-arabinofuranosida, L-arabinosidasa, o alfa-L-arabinanasa.

Para fines de la presente invención, actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa es determinada usando el 5 mg de arabinoxilano de trigo de viscosidad de medio (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irlanda) por ml de 100 mM acetato sódico pH 5 en un volumen total de 200 μ l durante 30 minutos a 40°C seguida de análisis de arabinosa por cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H.

[0032] Material celulósico: el material celulósico puede ser cualquier material que contiene celulosa.

El polisacárido predominante en la pared móvil primaria de biomasa es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa, y el tercer es pectina.

La pared celular secundaria, producido después de que la célula ha dejado de crecer, también contiene polisacáridos y se refuerza por lignina polimérica de manera covalente reticulado a hemicelulosa.

Celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y así un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanas, y mananos en estructuras ramificadas complejas con un espectro de sustituyentes.

Aunque generalmente polimorfo, celulosa es descubierta en tejido vegetal principalmente como una matriz de cristalino insoluble de cadenas de glucano paralelo.

Hemicelulosas normalmente enlaza de hidrógeno a celulosa, al igual que a otras hemicelulosas, que ayudan estabilizan la matriz de pared móvil.

[0033] Celulosa es generalmente descubierto, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascotes, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, derivaciones, y madera de árboles.

El material celulósico puede ser, pero no limitado a, material herbáceo, residuo agrícola, residuo de silvicultura, residuos sólidos municipales, papel de desecho, y pulpa y residuo de fábrica de papel (ver, por ejemplo, in Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp. 105-118, Taylor & Francis, Washington D.C. ; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16 ; Lynd, 1990, Applied Biochemistry y Biotechnology 24/25: 695- 719 ; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23-40, Springer- Verlag, New York). Es entendido aquí que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un material de pared móvil vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

En un aspecto preferido, el material celulósico es lignocelulosa.

[0034] En un aspecto, el material celulósico es material herbáceo.

En otro aspecto, el material celulósico es residuo agrícola.

En otro aspecto, el material celulósico es residuo de silvicultura.

En otro aspecto, el material celulósico es residuos sólidos municipales.

En otro aspecto, el material celulósico es papel de desecho.

En otro aspecto, el material celulósico es pulpa y residuo de fábrica de papel.

[0035] En otro aspecto, el material celulósico es rastrojos de maíz.

En otro aspecto, el material celulósico es fibra de maíz.

En otro aspecto, el material celulósico es mazorca de maíz.

En otro aspecto, el material celulósico es cáscara de naranja.

En otro aspecto, el material celulósico es paja de arroz.

En otro aspecto, el material celulósico es paja de trigo.

En otro aspecto, el material celulósico es pasto varilla.

En otro aspecto, el material celulósico es miscanthus.

En otro aspecto, el material celulósico es bagazo.

[0036] En otro aspecto, el material celulósico es celulosa microcristalina.

En otro aspecto, el material celulósico es celulosa bacteriana.

En otro aspecto, el material celulósico es celulosa algal.

En otro aspecto, el material celulósico es linter de algodón.

En otro aspecto, el material celulósico es celulosa tratada de ácido fosfórico amorfo.

En otro aspecto, el material celulósico es papel de filtro.

[0037] El material celulósico se puede utilizar como es o se puede someter a pretratamiento, usando métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en este caso.

En un aspecto preferido, el material celulósico es pretratado.

[0038] Rastrojos de maíz pretratados: el término "PCS" o "rastrojos de maíz pretratados" es definido aquí como un material celulósico derivado de forraje de maíz por tratamiento con calor y ácido sulfúrico diluido.

[0039] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" como usado aquí se refiere a un polipéptido que es aislado de una fuente.

En un aspecto preferido, el polipéptido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, de forma más preferible al menos 10% puro, de forma más preferible al menos 20% puro, de forma más preferible al menos 40% puro, de forma más preferible al menos 60% puro, incluso de forma más preferible al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, como determinado por SDS-PAGE.

[0040] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, de forma más preferible como mucho 6%, de forma más preferible como mucho 5%, de forma más preferible como mucho 4%, de forma más preferible como mucho 3%, incluso de forma más preferible como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, y de la forma incluso más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual es original o recombinantemente asociado.

Es, por lo tanto, preferido que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, de forma más preferible al menos 95% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 97% puro, de forma más preferible al menos 98% puro, incluso de forma más preferible al menos 99% puro, de la forma más preferible al menos 99,5% puro, e incluso de la forma más preferible 100% en peso puro del material de polipéptido total presente en la preparación.

Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, la preparación de polipéptido está esencialmente libre de otro material de polipéptido con el cual es original o recombinantemente asociado.

Esto puede ser realizado, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.

[0041] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" es definido aquí como un polipéptido en su forma final tras traducción y cualquier modificación postraduccionales, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 26 a 253 de SEC ID nº: 2 basado en el programa SignalP Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que aminoácidos 1 a 25 de SEC ID nº: 2 son un péptido señal.

[0042] Secuencia codificante de polipéptido maduro: el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" es definido aquí como una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad mejoradora celulolítica.

En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es nucleótidos 76 a 832 de SEC ID nº: 1 basada en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice que nucleótidos 1 a 75 de SEC ID nº: 1 codifican un péptido señal.

[0043] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos está descrita por el parámetro "identidad".

[0044] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol.

Biol. 48: 443-453) como implementado 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 por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión BLOSUM62 de EMBOSS).

La salida de Needle marcada "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculada de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos Idéntidos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de gaps en alineamiento})$$

[0045] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de desoxirribonucleótido es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, supra) como implementado 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 por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y matriz de sustitución EDNAFULL (versión NCBI NUC4.4 de EMBOSS).

La salida de Needle marcada "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculada de la siguiente manera:

$$(\text{Desoxirribonucleicos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de gaps en alineamiento})$$

[0046] Secuencia homóloga: el término "secuencia homóloga" es definido aquí como una proteína predicha con un valor 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., pp. 185-219) con el *Penicillium* sp. polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de SEC ID nº: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

[0047] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" es definido aquí como un polipéptido con uno o más (diferentes) aminoácidos eliminados del amino y/o terminal de carboxilo del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2; o una secuencia homóloga del mismo; donde el fragmento tiene actividad mejoradora celulolítica.

En un aspecto preferido, un fragmento contiene al menos 200 residuos de aminoácidos, de forma más preferible al menos 210 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 220 residuos de aminoácidos, del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o una secuencia homóloga de la misma.

[0048] Subsecuencia: el término "subsecuencia" es definido aquí como una secuencia de nucleótido con uno o más (diferentes) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC

ID nº: 1; o una secuencia homóloga de la misma; donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido con actividad mejoradora celulolítica.

En un aspecto preferido, una subsecuencia contiene al menos 600 nucleótidos, de forma más preferible al menos 630 nucleótidos, y de la forma más preferible al menos 660 nucleótidos de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o una secuencia homóloga de la misma.

[0049] Variante alélica: el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa la misma localización cromosómica.

Variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones.

Mutaciones de gen pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas.

Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0050] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" como usado aquí se refiere a un polinucleótido que es aislado de una fuente.

En un aspecto preferido, el polinucleótido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, de forma más preferible al menos 10% puro, de forma más preferible al menos 20% puro, de forma más preferible al menos 40% puro, de forma más preferible al menos 60%, puro incluso de forma más preferible al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, como determinado por electroforesis de agarosa.

[0051] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" como usado aquí se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente modificada.

Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, de forma más preferible como mucho 6%, de forma más preferible como mucho 5%, de forma más preferible como mucho 4%, de forma más preferible como mucho 3%, incluso de forma más preferible como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el cual es original o recombinantemente asociado.

Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones de origen natural 5' y 3' no traducidas, tales como promotores y terminadores.

Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90% puro, preferiblemente al menos 92% puro, de forma más preferible al menos 94% puro, de forma más preferible al menos 95% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 97%, puro incluso de forma más preferible al menos 98% puro, de la forma más preferible al menos 99% puro, e incluso de la forma más preferible al menos 99,5% puro en peso.

Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación polinucleótida es esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual es original o recombinantemente asociado.

Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinaciones de los mismos.

[0052] Secuencia codificante: cuando se usa aquí, el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico.

Los 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 extremidades con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA.

La secuencia codificante puede ser una secuencia de nucleótidos ADN, ADNc, sintética o recombinante.

[0053] ADNc: el término "ADNc" es definido aquí como una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula madura empalmada ARNm obtenida de una célula eucariota. ADNc carece de secuencias de intrón que pueden estar presente en el ADN genómico correspondiente.

La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor a ARNm que se procesa a través de una serie de pasos de que aparecer como ARNm empalmado maduro.

Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrón por un proceso llamado empalmar. ADNc derivado ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrón.

[0054] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una forma que de lo contrario no existirían en la naturaleza o que son sintéticos.

El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimos con el 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.

[0055] Secuencias de control: el término "secuencias de control" es definido aquí para incluir todos componentes 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 extraña entre sí.

Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción.

- 5 Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con motivo de introducir sitios de restricción específicos que facilitan ligación de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

- 10 [0056] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" denota aquí una configuración en que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de una secuencia polinucleótida tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

- 15 [0057] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

- 20 [0058] Vector de expresión: el término "vector de expresión" es definido aquí como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y es operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

- 25 [0059] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

- 30 [0060] Modificación: el término "modificación" significa aquí cualquier modificación química del polipéptido comprendiendo o consistente en el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2; o una secuencia homóloga de la misma; así como manipulación genética de la ADN que codifica tal co polipéptido.

- La modificación puede ser una sustitución, una eliminación y/o una inserción de uno o varios (diferentes) aminoácidos al igual que reemplazos de una o varias (diferentes) cadenas laterales de aminoácido.

- 35 [0061] Variante artificial: cuando se usa aquí, el término "variante artificial" significa un polipéptido con actividad mejoradora celolítica producido por un organismo que expresa una secuencia de polinucleótidos modificada de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1; o una secuencia homóloga de la misma.

- La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana por modificación de la secuencia de polinucleótidos descrita en SEC ID nº: 1; o una secuencia homóloga de la misma.

Descripción detallada de la invención

- 40 Polipéptidos con actividad mejoradora celolítica

[0062] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad mejoradora celolítica, seleccionados del grupo consistente en:

- 45 (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos 80% identidad al polipéptido maduro de SEC ID nº: 2;
(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 80% identidad a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1.

- 50 [0063] En una forma de realización la invención se refiere a un polipéptido aislado comprendiendo secuencias de aminoácidos con un grado de identidad al polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 de preferiblemente al menos 85%, incluso de forma más preferible al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, que tiene actividad mejoradora celolítica (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos").

- 55 En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos comprenden secuencias de aminoácidos que difieren por diez aminoácidos, preferiblemente por cinco aminoácidos, de forma más preferible por cuatro aminoácidos, incluso de forma más preferible por tres aminoácidos, de la forma más preferible por dos aminoácidos, e incluso de la forma más preferible por un aminoácido del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2.

- 60 [0064] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma con actividad mejoradora celolítica.

En un aspecto preferido, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende aminoácidos 26 a 253 de SEC ID nº: 2, o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma con actividad mejoradora celolítica.

- 65 En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende aminoácidos 26 a 253 de SEC ID nº: 2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma con actividad mejoradora celulolítica.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2.

5 En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en aminoácidos 26 a 253 de SEC ID nº: 2 o una variante alélica del mismo; o un fragmento del mismo con actividad mejoradora celulolítica.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en aminoácidos 26 a 253 de SEC ID nº: 2.

10 [0065] En una forma de realización del polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la invención se codifica por el polinucleótido contenido en plásmido pGEM-T-GH61 D23Y4 que es contenida en *E. coli* DSM 22882.

Fuentes de polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica

15 [0066] Un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género.

Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utilizan en este caso en relación con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos se produce por la fuente o por una cepa 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.

20 [0067] Un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano.

Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Stafilococo*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, u
25 *Oceanobacillus* con actividad mejoradora celulolítica, o un polipéptido bacteriano gram negativo tal como un polipéptido de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *helicobacteria*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, o *Ureaplasma* con actividad mejoradora celulolítica.

30 [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 mejoradora celulolítica.

35 [0069] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* con actividad mejoradora celulolítica.

[0070] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans* con actividad mejoradora
40 celulolítica.

[0071] Un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención 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 mejoradora celulolítica; o
45 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*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromices*,
50 *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizofilum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Termonascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria* con actividad mejoradora celulolítica.

[0072] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyce carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces
55 norbensis*, o *Saccharomyces oviformis* con actividad mejoradora celulolítica.

[0073] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus
60 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*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*,
65 *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete*

chrysosporium, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, or *Trichodemra viride* con actividad mejoradora celulolítica.

[0074] En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Penicillium* sp. con actividad mejoradora celulolítica.

En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido *Penicillium* sp.

NN051602 polipéptido con actividad mejoradora celulolítica, por ejemplo, el polipéptido comprende el polipéptido maduro de SEC ID n°: 2.

[0075] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especies por los que son conocidos.

Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

[0076] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivo, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0077] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas arriba.

Técnicas para aislamiento de microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido puede luego ser obtenido por selección similar de una genoteca de ADNc o genómica de tal microorganismo.

Una vez un polinucleótido que codifica un polipéptido ha sido detectado con la sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar usando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

[0078] Polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo.

Un polipéptido fusionado se produce por fundición de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) codificando otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención.

Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligando las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que éstas están en marco y que la expresión del polipéptido fusionado está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

[0079] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión.

En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando el polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la proteína de fusión.

Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, un sitio Kex2 que codifica el dipéptido Lys-Arg (Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; 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 se divide por una proteasa de Factor Xa después del residuo de arginina (Eaton et al., 1986, Biochem. 25: 505-512); un sitio Asp-Asp-Asp-Lys, que se divide por una enteroquinasa después de la lisina (Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987); un sitio His-Tyr-Glu sitio o His-Tyr-Asp, que se divide por Genenasa I Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248); un sitio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que se divide por trombina después del Arg (Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48); un sitio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln- Gly, que se divide por proteasa TEV después del Gln (Stevens, 2003, supra); y un sitio Leu-Glu-Val- Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que se divide por una forma genéticamente modificada de proteasa de rinovirus de humano 3C después del Gln (Stevens, 2003, supra).

Polinucleótidos

[0080] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención.

[0081] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en SEC ID n°: 1.

En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia contenida en plásmido pGEM-T-GH61D23Y4 contenido en *E. coli* DSM 22882.

En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1.

En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en nucleótidos 76 a 832 de SEC ID n°: 1.

En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante de polipéptido maduro contenida en plásmido pGEM-T-GH61 D23Y4 contenido en *E. coli* DSM 22882.

La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o el polipéptido maduro de la misma, que difieren de SEC ID nº: 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 SEC ID nº: 1 que codifican fragmentos de SEC ID nº: 2 que tienen actividad mejoradora celulolítica.

[0082] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de la misma.

La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de tal ADN genómico pueden ser efectuadas, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o selección de anticuerpo 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 tal como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA) pueden ser utilizados.

Los polinucleótidos se pueden clonar de una cepa de *Penicillium*, u otro u organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser un alélico o variante de especies de la región de codificación de polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0083] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 de preferiblemente al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, incluso de forma más preferible al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, que codifican un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica.

[0084] Modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido.

El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que ocurren de forma no natural.

Estos polipéptidos puede diferir en alguna vía diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similar.

La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificada por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso de codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótido que puede dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente.

Para una descripción general de sustitución de nucleótido, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0085] Será aparente a los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden ser hechas fuera de las regiones críticas a la función de la molécula y todavía resultar en un polipéptido activo.

Residuos de aminoácidos esenciales a la actividad del polipéptido codificados por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sometidos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, supra).

En la última técnica, mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad mejoradora celulolítica para identificar residuos aminoácidos que son críticos a la actividad de la molécula.

Sitios de interacción enzima-sustrato también pueden ser determinados por análisis de la estructura tridimensional como determinados por tales técnicas como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad (ver, por ejemplo, e Vos et al., 1992, supra; Smith et al., 1992, supra; Wlodaver et al., 1992, supra).

Constructos de ácidos nucleicos

[0086] Se describen constructos de ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazados a una o varias (diferentes) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0087] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de vías para proveer la expresión del polipéptido.

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 secuencias polinucleótidas de modificación usando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

5

[0088] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que se reconoce 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 la expresión del polipéptido.

10 El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo mutante, truncado, y promotores híbridos, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogo a la célula huésped.

15 [0089] 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*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amilo), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), genes xylA y xylB de *Bacillus*, y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25).

20 Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" Scientific American, 1980, 242: 74-94 ; y en Sambrook et al., 1989, supra.

25 [0090] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para *Aspergillus oryzae* TAKA amilasa, *Rhizomucor miehei* aspartic proteinasa, *Aspergillus niger* neutral alpha-amilasa, *Aspergillus niger* acid stable alpha-amilasa, *Aspergillus niger* or *Aspergillus awamori* glucoamilasa (glaA), *Rhizomucor miehei* lipasa, *Aspergillus oryzae* alkaline proteasa, *Aspergillus oryzae* triose phosphate isomerasa, *Aspergillus nidulans* acetamidasa, *Fusarium venenatum* amyloglucosidasa (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa *Fusarium oxysporum* tipo tripsina (WO 96/00787), *Trichoderma reesei* beta-glucosidasa, *Trichoderma reesei* cellobiohidrolasa I, *Trichoderma reesei* cellobiohidrolasa II, *Trichoderma reesei* endoglucanasa I, *Trichoderma reesei* endoglucanasa II, *Trichoderma reesei* endoglucanasa III, *Trichoderma reesei* endoglucanasa IV, *Trichoderma reesei* endoglucanasa V, *Trichoderma reesei* xylanasa I, *Trichoderma reesei* xylanasa II, *Trichoderma reesei* beta-xylosidas, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado del gen que codifica alfa-amilasa neutra en el *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans*); y promotores híbridos de los mismos mutantes y truncados.

40 [0091] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* enolasa (ENO-1), *Saccharomyces cerevisiae* galactokinasa (GAL1), deshidrogenasa de dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*.

45 Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritas por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0092] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocido por una célula huésped para terminar transcripción.

La secuencia terminadora es operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

50 Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0093] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para proteasa *Aspergillus oryzae* TAKA amilasa, *Aspergillus niger* glucoamilasa, *Aspergillus nidulans* anthranilate synthasa, *Aspergillus niger* alpha-glucosidasa, y *Fusarium oxysporum* tipo trypsin.

55

[0094] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidas de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

60 Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritas por Romanos et al., 1992, supra.

[0095] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para traducción por la célula huésped.

La secuencia líder es operativamente enlazada al terminal 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

65

Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0096] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para *Aspergillus oryzae* TAKA amilasa y *Aspergillus nidulans* triose fosfato isomerasa.

[0097] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* enolasa (ENO-1), *Saccharomyces cerevisiae* 3-phosphoglycerate kinasa, *Saccharomyces cerevisiae* alfa-factor, y *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (ADH2/GAP).

[0098] 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 transcrito, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito.

Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0099] Secuencias de poliadenilación preferida para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para *Aspergillus oryzae* TAKA amilasa, *Aspergillus niger* glucoamilasa, *Aspergillus nidulans* anthranilate synthasa, proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y *Aspergillus niger* alpha-glucosidasa.

[0100] Secuencias de poliadenilación útil para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

[0101] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al amino terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula.

El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazado 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 del péptido señal que es extraño a la secuencia codificante.

La secuencia codificante de péptido señal foráneo se puede requerir donde la secuencia codificante naturalmente no contiene una secuencia codificante del péptido señal.

Alternativamente, la secuencia codificante de péptido señal foráneo puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar secreción del polipéptido.

No obstante, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección, es decir, segregado en un medio de cultivo, se puede utilizar en la presente invención.

[0102] 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 de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y *Bacillus subtilis* prsA.

Otros péptidos señal son descritos por Simonen and Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0103] Secuencias de codificación de péptido señal eficaz para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias de codificación de péptido señal obtenidas de los genes para *Aspergillus oryzae* TAKA amilasa, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* glucoamilasa, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, y lipasa *Humicola lanuginosa*.

[0104] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para *Saccharomyces* alfa-factor de *cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otras secuencias de codificación de péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.

[0105] En un aspecto preferido, el péptido señal comprende o consiste en aminoácidos 1 a 25 de SEC ID n°: 2.

En otro aspecto preferido, la secuencia codificante del péptido señal comprende o consiste en nucleótidos 1 a 75 de SEC ID n°: 1.

[0106] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica un propéptido posicionado 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 es generalmente inactivo y se pueden convertir en un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido.

La secuencia codificante de propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y *Myceliophthora lacasa thermophila* (WO 95/33836).

5 [0107] Donde ambos péptido señal y secuencias de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situado junto al amino terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situado junto al amino terminal de la secuencia de propéptido.

10 [0108] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permite la regulación de la expresión del polipéptido relativamente al crecimiento de la célula huésped.

Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan que la expresión del gen sea encendida o apagada en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador.

Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen el lac, tac, y trp sistemas operadores.

En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado.

15 En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, promotor de *Aspergillus niger* glucoamilasa, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se puede utilizar como secuencias reguladoras.

Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica.

En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados.

20 En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido sería operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

25 [0109] Se describen vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional.

Los varios ácidos nucleicos y secuencias de control descritos aquí se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que pueden incluir uno o varios (diferentes) sitios de restricción convenientes para permitir para inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido a tales sitios.

30 Alternativamente, una secuencia de polinucleótidos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión.

En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante es operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

35 [0110] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueden provocar expresión de la secuencia de nucleótidos.

La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en que el vector debe ser introducido.

40 Los vectores puede ser lineal o cerrado plásmidos circulares.

[0111] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.

45 El vector puede contener cualquier medio para asegurar autorreplicación.

Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y es replicado con el cromosoma(s) en que ha sido integrado.

50 Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede ser utilizado.

[0112] Los vectores contienen uno o varios (diferentes) marcadores seleccionables que permiten selección fácil de células transformadas, modificadas, transducida, o similar.

55 Una etiqueta seleccionable es un gen el producto del cual proporciona biocida o resistencia vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similar.

[0113] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes del *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a ampicilina, canamicina, cloranfenicol, o tetraciclina.

60 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 de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos.

65 Preferido para usar en una célula de *Aspergillus* son el *amdS* y *pyrG* genes de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0114] Los vectores preferiblemente contienen un elemento(s) que permite integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0115] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por homólogos o recombinación no homóloga.

Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped a una ubicación(es) precisa en el cromosoma(s).

Para aumentar la probabilidad de integración a una ubicación precisa, los elementos integracionales debería preferiblemente contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10,000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10,000 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a 10,000 pares de bases, que tienen un grado alto de identidad a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga.

Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped.

Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificación o codificantes.

Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0116] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo al vector que se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión.

El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido mediante replicación autónoma que funciona en una célula.

El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" es definido aquí como una secuencia de nucleótidos que habilita un plásmido o vector a replicar in vivo.

[0117] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 permitiendo replicación en el *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1 permitiendo replicación en el *Bacillus*.

[0118] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el 2 origen de micra de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0119] Ejemplos de orígenes de replicación útil 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).

Aislamiento del gen AMA1 y construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0120] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar producción del producto génico.

Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen etiqueta seleccionable amplificable con el polinucleótido donde células que contienen copias amplificadas del gen etiqueta seleccionable, y copias así adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar al cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0121] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

[0122] Se describen células huésped recombinantes, que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención, que son ventajosamente usados en la producción recombinante de los polipéptidos con actividad mejoradora celolítica.

Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se describe anteriormente.

El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que es no idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante replicación.

La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0123] La célula huésped puede ser cualquier útil célula en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0124] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram positiva o una bacteria Gram negativa.

Bacterias gram positivas incluyen, pero no limitado a, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *estafilococo*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, y *Oceanobacillus*.

Bacterias gram negativas incluyen, pero no limitado a, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *helicobacteria*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, y *Ureaplasma*.

[0125] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*.

Células de *Bacillus* útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, 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*.

[0126] La célula huésped bacteriana puede ser 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 *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*.

[0127] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*.

Células de *Streptococcus* útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*.

[0128] La célula huésped bacteriana puede ser una célula *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 *Streptococcus uberis*.

En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*.

[0129] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*.

Células de *Streptomyces* útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

[0130] La célula huésped bacteriana puede ser una célula *Streptomyces achromogenes*.

En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula *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 *Streptomyces griseus*.

En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula *Streptomyces lividans*.

[0131] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111- 115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Oung and Spizizen, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823- 829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), por electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o por conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5271-5278).

La introducción de ADN en una célula *E coli* puede, por ejemplo, ser efectuado por transformación de protoplasto (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 efectuado por transformación de protoplasto 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. US* 98: 6289-6294).

La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, ser efectuado por electroporación (ver, por ejemplo, Choi et al., 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) o por conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo and 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, *Infected. Immun.* 32: 1295-1297), por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Catt and Jollick, 1991, *Microbios.* 68: 189-207, 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 introducción de ADN en una célula huésped puede ser usado.

[0132] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como un mamífero, insecto, planta, o célula fúngica.

[0133] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Fungi" como se utiliza en este caso incluye *Ascomycota phyla*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, y *Zygomycota* (como definido por Hawkswort et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, RU) al igual que la *Oomycota* (como citado en el Hawkswort et al., 1995, supra, página 171) y todos hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, supra).

[0134] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes).

Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0135] La célula huésped de levadura puede ser una célula *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

[0136] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Saccharomyce 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*.

[0137] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como definido por Hawkswort et al., 1995, supra).

Los hongos filamentosos son generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos.

Crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico.

En cambio, crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y catabolismo de carbono pueden ser fermentativo.

[0138] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaportia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Termonascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0139] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bacridioides*, *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 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 aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermisporea*, *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*, o *Trichoderma viride*.

[0140] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso implicando formación de protoplasto, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular de una forma conocida de por sí.

Procedimientos adecuados para transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* son descritas en EP 238 023 y 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470- 1474.

Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritas por Malardier et al., 1989, gen 78: 147-156, y WO 96/00787.

Levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York ; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163 ; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920

Métodos de producción

[0141] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

En un aspecto preferido, la célula es del género *Penicillium*.

5 En un aspecto más preferido, la célula es *Penicillium* sp. NN051602.

[0142] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo una célula huésped recombinante, como se describe en este caso, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

10 [0143] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, y fermentación de escala pequeña o gran escala (incluyendo, continuo, lote, lote alimentado, o fermentaciones de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido ser expresada y/o aislado.

15 El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection).

20 Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega en el medio, se puede recuperar de lisatos de célula.

[0144] Los polipéptidos se pueden detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos.

25 Estos métodos de detección pueden incluir uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático.

Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

30 [0145] El polipéptido resultante se puede recuperar usando métodos conocido en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

35 [0146] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocida en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatofoque, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

40 Composiciones

[0147] Describas son composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

Las composiciones se pueden enriquecer en tal polipéptido.

45 El término "enriquecido" indica que la actividad mejoradora celulolítica de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0148] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático mayor, por ejemplo, una composición monocomponente.

50 Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tal como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, glucosidasa alfa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasas.

55 La enzima(s) adicional puede ser producida, por ejemplo, por un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium*, *toruloseum* *Fusarium trichothecioides*, o *Venenatum* de *Fusarium*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Lanuginosa* de *humicola*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

65

[0149] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca.

Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un microgranulado.

El polipéptido a ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0150] Ejemplos son dados por debajo 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 que la composición se usan pueden ser determinadas basándose en métodos conocidos en la técnica.

Procesamiento de material celulósico

[0151] La presente invención también se refiere a métodos para degradar o convertir un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en la presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención.

En un aspecto preferido, el método comprende además recuperación del material celulósico degradado o convertido.

[0152] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un producto de fermentación, que comprende: (a) sacarificación de un material celulósico con una composición enzimática en la presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención; (b) fermentación del material celulósico sacarificado con uno o más (diferentes) microorganismos de fermentación para producir el producto de fermentación; y (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

[0153] La presente invención también se refiere a métodos de fermentación de un material celulósico, que comprende: fermentación del material celulósico con uno o varios (diferentes) microorganismos de fermentación, donde el material celulósico se sacrifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención.

En un aspecto preferido, la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación.

En otro aspecto preferido, el método comprende además recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

[0154] El polipéptido con actividad mejoradora celulolítica puede estar en forma de un caldo de fermentación crudo con o sin las células quitadas o en forma de una preparación semi-purificada o purificada enzimática o la composición pueden comprender una célula huésped descrita aquí como una fuente del polipéptido con actividad mejoradora celulolítica en un proceso de fermentación con la biomasa.

[0155] Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para sacarificar un material celulósico a azúcares fermentables y convertir los azúcares fermentables a muchas sustancias útiles, por ejemplo, productos químicos y combustibles.

La producción de un producto de fermentación deseado de material celulósico implica típicamente pretratamiento, hidrólisis enzimática (sacarificación), y fermentación.

[0156] El material celulósico de procesamiento según la presente invención se puede conseguir usando de procesos convencional en la técnica. Además, los métodos de la presente invención se pueden implementar utilizando cualquier equipo de tratamiento de biomasa convencional configurado para operar conforme a la invención.

[0157] Hidrólisis (sacarificación) y fermentación, separada o simultánea, incluye, pero de forma no limitativa, hidrólisis separada y fermentación (SHF); sacarificación simultánea y fermentación (SSF); sacarificación simultánea y cofermentación (SSCF); hidrólisis híbrida y fermentación (HHF); hidrólisis separada y co-fermentación (SHCF), hidrólisis híbrida y fermentación (HHCF), y conversión microbiana directa (DMC).

SHF usa pasos de proceso separados para primero hidrolizar enzimáticamente lignocelulosa a azúcares fermentables, por ejemplo, glucosa, celobiosa, celotriosa, y azúcares de pentosa, y luego fermentar los azúcares fermentables a etanol.

En la SSF, la hidrólisis enzimática de lignocelulosa y la fermentación de azúcares a etanol se combinan en un paso (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

SSCF implica la cofermentación de azúcares múltiples (Sheehan, J., e Himmel, M., 1999, Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol, Biotechnol. Prog. 15: 817-827).

HHF implica un paso de hidrólisis separada, y además una sacarificación simultánea y paso de hidrólisis, que puede efectuarse en el mismo reactor.

Los pasos en un proceso HHF pueden llevarse a cabo a temperaturas diferentes, es decir, sacarificación enzimática de alta temperatura seguida de SSF a una temperatura inferior que la cepa de fermentación puede tolerar.

DMC combina los tres procesos (producción enzimática, hidrólisis de lignocelulosa, y fermentación) en unos pasos donde el mismo organismo se utiliza para producir las enzimas para conversión de la lignocelulosa a azúcares fermentables y para convertir los azúcares fermentables en un producto final (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W.

H., y Pretorius, I. S., 2002, utilización de celulosa microbiana: Fundamentals y biotechnology, Microbiol. Mol. Biol. Reviews 66: 506-577).

Es entendido aquí que cualquier método conocido en la técnica que comprende pretratamiento, hidrólisis enzimática (sacarificación), fermentación, o una combinación de las mismas se puede usar al practicar los métodos de la presente invención.

[0158] Un equipo convencional puede incluir un reactor agitado de alimentación por lotes, un reactor agitado de lote, un reactor agitado de flujo continuo con ultrafiltración, y/o un reactor de columna de flujo de pistón continuo (Fernanda de Castilhos Corazza, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin e Ivo Neitzel, 2003, Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis, Acta Scientiarum.

Technology 25: 33-38; Gusakov, A. V., y Sinitsyn, A. P., 1985, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1.

Un modelo matemático para un proceso de reactor de funcionamiento discontinuo, Enz. Microb. Technol. 7: 346-352), un reactor de fricción (Ryu, S. K., and Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, Biotechnol. Bioeng. 25: 53-65), o un reactor con intensivo agitador inducido por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, Appl.

Biochem. Biotechnol. 56: 141-153).

Tipos de reactor adicional incluyen: reactores tipo lecho fluidificado, manta de flujo ascendente, inmovilizado, y extrusor para hidrólisis y/o fermentación.

[0159] Pretratamiento. Al practicar los métodos de la presente invención, cualquier proceso de pretratamiento conocido en la técnica puede utilizarse para interrumpir los componentes de pared celular vegetal (Chandra et al., 2007, Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? Adv. Biochem. retreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, Adv. Biochem. Engin. / Biotechnol. 108: 41-65; Hendriks and Zeeman, 2009, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, Bioresource Technol. 100: 10-18; Mosier et al., 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, Bioresource Technol. 96: 673-686; Taherzadeh and Karimi, 2008, Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, Int. J. of Mol. Sci. 9: 1621-1651 ; Yang and Wyman, 2008, Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol, Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofr. 2: 26-40).

[0160] El material celulósico puede también ser sometido a reducción de tamaño de partícula, pre-remojo, humidificación, lavado, o preparación antes del uso de pretratamiento métodos conocido en la técnica. Pretratamientos convencionales incluyen, pero de forma no limitativa, pretratamiento de vapor (con o sin explosión), pretratamiento de ácido diluido, pretratamiento de agua caliente, pretratamiento alcalino, pretratamiento de cal, oxidación en húmedo, explosión en húmedo, explosión de fibra de amoníaco, pretratamiento organosolv, y pretratamiento biológico.

Pretratamientos adicionales incluyen filtración de amoníaco, ultrasonido, electroporación, microondas, supercrítico CO₂, supercrítico H₂O, ozono, y pretratamientos de irradiación gamma.

[0161] El material celulósico se puede pretratar antes de hidrólisis y/o fermentación.

Pretratamiento es preferiblemente realizado antes de la hidrólisis.

Alternativamente, el pretratamiento puede llevarse a cabo simultáneamente con hidrólisis, tal como simultáneamente con tratamiento del material celulósico con una composición enzimática de la presente invención para liberar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, y/o celobiosa.

En la mayoría de los casos el paso de pretratamiento mismo produce alguna conversión de biomasa a azúcares fermentables (incluso en ausencia de enzimas).

[0162] Pretratamiento de vapor. En el pretratamiento de vapor, el material celulósico se calienta para interrumpir los componentes de pared celular vegetal, incluyendo lignina, hemicelulosa, y celulosa para hacer la celulosa y otras fracciones, por ejemplo, hemicelulosa, accesible a enzimas.

El material de lignocelulosa se pasa a o a través de un recipiente de reacción donde vapor se inyecta para aumentar la temperatura a la temperatura y presión requeridas y se retiene ahí durante el tiempo de reacción deseado.

Pretratamiento de vapor es preferiblemente hecho a 140-230°C, de forma más preferible 160-200°C, y de la forma más preferible 170-190°C, donde la gama de temperatura óptima depende del cualquier adición de un catalizador químico.

Periodo de permanencia para el pretratamiento de vapor es preferiblemente 1-15 minutos, de forma más preferible 3-12 minutos, y de la forma más preferible 4- 10 minutos, donde el periodo de permanencia óptimo depende de la gama de temperatura y cualquier adición de un catalizador químico.

Pretratamiento de vapor permite cargas de sólidos relativamente altas, de modo que el material celulósico es generalmente solo húmedo durante el pretratamiento.

El pretratamiento de vapor es frecuentemente combinado con una descarga explosiva del material después del pretratamiento, que es conocido como explosión de vapor, esto es, rápido intermitente a presión atmosférica y régimen turbulento del material para aumentar el área de superficie accesible por fragmentación (Duff and Murray, 1996, Bioresource Technology 85: 1-33; Galbe and Zacchi, 2002, Appl.

Microbiol. Biotechnol. 59: 618-628; U.S. Patent Application No 20020164730).

Durante pretratamiento de vapor, grupos de acetilo de hemicelulosa se dividen y el ácido resultante autocataliza hidrólisis parcial de la hemicelulosa para monosacáridos y oligosacáridos.
Lignina se quita solo hasta un punto limitado.

- 5 [0163] Un catalizador tal como H₂SO₄ o SO₂ (típicamente 0,3 a 3% p/p) es frecuentemente adicionado antes del pretratamiento de vapor, que reduce el tiempo y temperatura, aumenta la recuperación, y mejora hidrólisis enzimática (Ballesteros et al., 2006, Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132: 496- 508; Varga et al., 2004, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116: 509-523; Sassner et al., 2006, Enzyme Microb. Technol. 39: 756-762).
- 10 [0164] Pretratamiento químico: el término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina. Ejemplos de procesos de pretratamiento químico adecuado incluyen, por ejemplo, pretratamiento de ácido diluido, pretratamiento de cal, oxidación en húmedo, explosión por congelación de la fibra de amoníaco (AFEX), filtración de amoníaco (apr), y pretratamientos organosolv.
- 15 [0165] En el pretratamiento de ácido diluido, el material celulósico se mezcla con ácido diluido, típicamente H₂SO₄, y agua para formar un lodo, calentado por vapor a la temperatura deseada, y tras un periodo de permanencia relampagueado a presión atmosférica.
- 20 El pretratamiento de ácido diluido se puede realizar con varios diseños de reactor, por ejemplo, reactores de flujo de pistón, reactores de contracorriente, o reactores de encogimiento de contracorriente continua de lecho (Duff and Murray, 1996, supra; Schell et al., 2004, Bioresource Technol. 91: 179-188; Lee et al., 1999, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 65: 93-115).
- 25 [0166] Diferentes métodos de pretratamiento bajo condiciones alcalinas también pueden usarse. Estos pretratamientos alcalinos incluyen, pero de forma no limitativa, pretratamiento de cal, oxidación en húmedo, filtración de amoníaco (APR), y explosión por congelación de la fibra de amoníaco (AFEX).
- 30 [0167] Pretratamiento de cal se realiza con carbonato cálcico, hidróxido sódico, o amoníaco a bajas temperaturas de 85-150°C y tiempos de estancia de 1 hora a más días (Wyman et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 1959-1966; Mosier et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 673-686). WO 2006/110891, WO 2006/11899, WO 2006/11900, y WO 2006/110901 revelan uso de métodos de pretratamiento de amoníaco.
- 35 [0168] Oxidación en húmedo es un pretratamiento térmico realizado típicamente a 180-200°C durante 5-15 minutos con adición de un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o sobrepresión de oxígeno (Schmidt and Thomsen, 1998, Bioresource Technol. 64: 139-151; Palonen et al., 2004, Appl. Biochem. Biotechnol. 117: 1-17; Varga et al., 2004, biotechnol. Bioeng. 88: 567-574; Martin et al., 2006, J. Chem. Technol. Biotechnol. 81: 1669-1677). El pretratamiento se realiza a preferiblemente 1- 40% sustancia seca, de forma más preferible 2-30% sustancia
- 40 seca, y de la forma más preferible 5-20% sustancia seca, y frecuentemente el pH inicial se aumenta por la adición de álcali tal como carbonato de sodio.
- [0169] Una modificación del método de pretratamiento de oxidación en húmedo, conocido como explosión en húmedo (combinación de oxidación en húmedo y explosión de vapor), puede manejar sustancia seca hasta 30%.
- 45 En la explosión en húmedo, el agente oxidante se introduce durante pretratamiento tras un determinado tiempo de estancia. El pretratamiento es luego cesado por destello a presión atmosférica (WO 2006/032282).
- [0170] Explosión de fibra de amoníaco (AFEX) implica material celulósico de tratamiento con líquido o amoníaco gaseoso a temperaturas moderadas tales como 90-100°C y alta presión tal como 17-20 bar durante 5-10 minutos, donde el contenido de sustancia en seco puede ser tan alto como 60% (Gollapalli et al., 2002, Appl. Biochem. Biotechnol. 98: 23-35; Chundawat et al., 2007, biotechnol. Bioeng. 96: 219-231; Alizadeh et al., 2005, Appl. Biochem. Biotechnol. 121:1133-1141; Teymouri et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 2014-2018).
- 50 Pretratamiento AFEX produce la despolimerización de celulosa e hidrólisis parcial de hemicelulosa.
- 55 Complejos de lignina-carbohidrato son divididos.
- [0171] Pretratamiento Organosolv delignifica material celulósico por etanol acuoso de uso de extracción (40-60% etanol) a 160-200°C durante 30-60 minutos (Pan et al., 2005, Biotechnol. Bioeng. 90: 473-481; Pan et al., 2006, Biotechnol. Bioeng. 94: 851-861; Kurabi et al., 2005, Appl. Biochem. Biotechnol. 121:219-230). Ácido sulfúrico es normalmente adicionado como un catalizador.
- 60 En el pretratamiento organosolv, la mayoría de la hemicelulosa es quitada.
- [0172] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuado son descritos por Schell et al., 2003, Appl. Biochem. y Biotechnol.
- 65 Vol. 105-108, p. 69-85, y Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686, and U.S. Published Application 2002/0164730.

- [0173] En un aspecto, el pretratamiento químico es preferiblemente realizado como un tratamiento ácido, y de forma más preferible como un diluido continuo y/o tratamiento de ácido moderado.
El ácido es típicamente ácido sulfúrico, pero otros ácidos también pueden usarse, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno o mezclas derivadas.
5 Tratamiento de ácido moderado se conduce en un margen de pH de preferiblemente 1-5, de forma más preferible 1-4, y de la forma más preferible 1-3.
En un aspecto, la concentración ácida está en el rango de preferiblemente 0,01 a 20 % en peso ácido, de forma más preferible 0,05 a 10 % en peso ácido, incluso de forma más preferible 0,1 a 5 % en peso ácido, y de la forma más
10 preferible 0,2 a 2,0 % en peso ácido.
El ácido es contactado con el material celulósico y sujetado a una temperatura en el rango de preferiblemente 160-220°C, y de forma más preferible 165-195°C, para periodos que varían de segundos a minutos a, por ejemplo, 1 segundo a 60 minutos.
- [0174] En otro aspecto, pretratamiento se realiza como un paso de explosión de fibra de amoníaco (paso pretratamiento AFEX).
- [0175] En otro aspecto, pretratamiento tiene lugar en un lodo acuoso.
En aspectos preferidos, el material celulósico está presente durante pretratamiento en cantidades preferiblemente
20 entre 10-80 % en peso, de forma más preferible entre 20-70 % en peso, y de la forma más preferible entre 30-60 % en peso, tal como alrededor de 50 % en peso.
El material celulósico pretratado puede ser sin lavar o lavado utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, lavado con agua.
- [0176] Pretratamiento mecánico: el término "pretratamiento mecánico" se refiere a tipos varios de trituración o fresado (por ejemplo, molienda en seco, molienda en húmedo, o fresado de bola vibratoria).
- [0177] Pretratamiento físico: el término "pretratamiento físico" se refiere en cualquier pretratamiento que promueve la separación y/o liberar celulosa, hemicelulosa, y/o lignina de material celulósico.
30 Por ejemplo, pretratamiento físico puede implicar irradiación (por ejemplo, irradiación de microondas), explosión de vaporización/vapor, hidrotermólisis, y combinaciones de los mismos.
- [0178] Pretratamiento físico puede implicar alta presión y/o alta temperatura (explosión de vapor).
En un aspecto, alta presión quiere decir en el rango de preferiblemente aproximadamente 300 a aproximadamente
35 600 psi, de forma más preferible aproximadamente 350 a aproximadamente 550 psi, y de la forma más preferible aproximadamente 400 a aproximadamente 500 psi, tal como alrededor de 450 psi.
En otro aspecto, alta temperatura quiere decir en el rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 300°C, preferiblemente aproximadamente 140 a aproximadamente 235°C.
En un aspecto preferido, pretratamiento mecánico se realiza en un procesamiento por lote, sistema de hidrolizador
40 de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, un Sunds Hydrolyzer disponible de Sunds Defibrator, AB, Suecia.
- [0179] Pretratamiento físico combinado y químico: el material celulósico se puede pretratar tanto físicamente como químicamente.
45 Por ejemplo, el paso de pretratamiento puede implicar diluido o tratamiento de ácido moderado y alta temperatura y/o tratamiento de presión.
Los pretratamientos físicos y químicos pueden llevarse a cabo consecutivamente o simultáneamente, como deseado.
Un pretratamiento mecánico puede ser incluido también.
- [0180] Por consiguiente, en un aspecto preferido, el material celulósico está sujeto a pretratamiento mecánico, químico, o físico, o cualquier combinación de la misma para promover la separación y/o liberar celulosa, hemicelulosa y/o lignina.
- [0181] Pretratamiento biológico: el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material celulósico.
Técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar aplicación de microorganismos de solubilización de lignina (ver, por ejemplo, Hsu, T., 1996, Pretreatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212 ; Ghosh and Singh, 1993, Physicochemical and
60 biological treatments for enzymatic/microbial conversion of cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15 ; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag
65 Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207- 241 ; Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996, Fermentation of lignocellulosic

hydrolysates for ethanol production, *Enz. Microb. Tech.* 18: 312-331 ; and Vallander and Eriksson, 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 42: 63-95).

[0182] Sacarificación. En el paso de hidrólisis, también conocido como sacarificación, el material celulósico, por ejemplo, pretratado, se hidroliza para descomponer celulosa y alternativamente también hemicelulosa a azúcares fermentables, tal como glucosa, celobiosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, manosa, galactosa, u oligosacáridos solubles. La hidrólisis se realiza enzimáticamente por una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención.

La composición puede además comprender una o varias enzimas hemicelulolíticas.

Las enzimas de las composiciones también pueden ser adicionadas consecutivamente.

[0183] Hidrólisis enzimática es preferiblemente realizada en un entorno acuoso adecuado bajo condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. En un aspecto preferido, hidrólisis es realizada bajo condiciones adecuadas para la actividad de la enzima(s), es decir, óptimo para la enzima(s).

La hidrólisis puede llevarse a cabo como un flujo continuo o proceso continuo donde el material celulósico pretratado (sustrato) se alimenta gradualmente a, por ejemplo, una solución de hidrólisis que contiene enzima.

[0184] La sacarificación es generalmente realizada en los reactores de tanque agitado o fermentadores bajo pH controlado pH, temperatura, y condiciones de mezcla.

Condiciones de tiempo de proceso, temperatura y pH adecuadas pueden prontamente ser determinadas por un experto en la técnica. Por ejemplo, la sacarificación puede durar hasta 200 horas, pero es típicamente realizada durante preferiblemente aproximadamente 12 a aproximadamente 168 horas, de forma más preferible aproximadamente 24 a aproximadamente 120 horas, y de la forma más preferible aproximadamente 48 a aproximadamente 72 horas.

La temperatura está en el rango de preferiblemente aproximadamente 40°C a aproximadamente 70°C, de forma más preferible aproximadamente 45°C a aproximadamente 65°C, y de forma más preferible aproximadamente 50°C a 60°C, en particular aproximadamente 55°C.

El pH está preferiblemente en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, de forma más preferible aproximadamente 3,5 a aproximadamente 8, de forma más preferible aproximadamente 4 a aproximadamente 7, y de la forma más preferible aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6, en particular alrededor de pH 5.

El contenido en sustancias secas es en el rango de preferiblemente aproximadamente 1 a aproximadamente 50 % en peso, de forma más preferible aproximadamente 5 a aproximadamente 40 % en peso, de forma más preferible aproximadamente 10 a aproximadamente 30 % en peso, y de la forma más preferible aproximadamente 15 a aproximadamente 25 % en peso.

[0185] Además de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención, los componentes enzimáticos celulolíticos de la composición son preferiblemente enzimas con endoglucanasa, celobiohidrolasa, y actividades de beta-glucosidasa.

En un aspecto preferido, la composición enzimática comprende una o varias (diferentes) enzimas celulolíticas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

En otro aspecto preferido, la preparación enzimática celulolítica comprende además o más una o varias actividades enzimáticas adicionales seleccionadas del grupo consistente en hemicelulasas, esterasas (por ejemplo, lipasas, fosfolipasas, y/o cutinasas), proteasas, lacasas, peroxidases, o mezclas derivadas.

En los métodos de la presente invención, la enzima(s) adicional se puede adicionar antes o durante la fermentación, incluyendo durante o después de la propagación del microorganismo(s) de fermentación.

[0186] Las enzimas se pueden derivar u obtener de cualquier origen adecuado, incluyendo origen bacteriano, fúngico, levadura, planta, u mamífero.

El término "obtener" significa aquí que la enzima puede haber sido aislada de un organismo que produce naturalmente la enzima como una enzima nativa.

El término "obtener" significa también aquí que la enzima puede haber sido producida recombinantemente en un organismo huésped usando métodos descritos aquí, donde la enzima producida recombinantemente es bien nativa o extranjera al organismo huésped o tiene una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, con uno o varios aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida recombinantemente que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácido nucleico conocidos en la técnica. En el significado de una enzima nativa se incluyen variantes naturales y en el significado de una enzima extranjera hay variantes de recombinación obtenidas, tales como por mutagénesis dirigida al sitio o redistribución.

[0187] Las enzimas usadas en la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para su uso en los métodos descritos aquí, tales como un caldo de fermentación crudo con o sin células o polipéptidos sustancialmente puros.

La enzima(s) puede ser un polvo seco o granulado, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima(s) protegida.

Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico según proceso establecido.

[0188] Las cantidades óptimas de las enzimas y polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica dependen de diferentes factores incluyendo, pero no limitado a, la mezcla de enzimas celulolíticas de componente, el sustrato celulósico, la concentración de sustrato celulósico, el pretratamiento(s) del sustrato celulósico, temperatura, tiempo, pH, e inclusión de organismo fermentador (por ejemplo, levadura para sacarificación simultánea y fermentación).

[0189] En un aspecto preferido, una cantidad eficaz de enzima(s) celulolítica a material celulósico es aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 50 mg, preferiblemente en alrededor de 0,5 a aproximadamente 40 mg, de forma más preferible en alrededor de 0,5 a aproximadamente 25 mg, de forma más preferible en alrededor de 0,75 a aproximadamente 20 mg, de forma más preferible en alrededor de 0,75 a aproximadamente 15 mg, incluso de forma más preferible en alrededor de 0,5 a aproximadamente 10 mg, y de la forma más preferible en alrededor de 2,5 a aproximadamente 10 mg por g de material celulósico.

[0190] En otro aspecto preferido, una cantidad eficaz de polipéptido(s) con actividad mejoradora celulolítica a material celulósico es aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50,0 mg, preferiblemente aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 mg, de forma más preferible aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, de forma más preferible aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg, de forma más preferible aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg, de forma más preferible aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg, de forma más preferible en alrededor de 0,025 a aproximadamente 1,5 mg, de forma más preferible en alrededor de 0,05 a aproximadamente 1,25 mg, de forma más preferible en alrededor de 0,075 a aproximadamente 1,25 mg, de forma más preferible en alrededor de 0,1 a aproximadamente 1,25 mg, incluso de forma más preferible en alrededor de 0,15 a aproximadamente 1,25 mg, y de la forma más preferible en alrededor de 0,25 a aproximadamente 1,0 mg por g de material celulósico.

[0191] En otro aspecto preferido, una cantidad eficaz de polipéptido(s) con actividad mejoradora celulolítica a enzima(s) celulolítica es aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 g, preferiblemente en alrededor de 0,01 a aproximadamente 1,0 g, de forma más preferible en alrededor de 0,15 a aproximadamente 0,75 g, de forma más preferible en alrededor de 0,15 a aproximadamente 0,5 g, de forma más preferible en alrededor de 0,1 a aproximadamente 0,5 g, incluso de forma más preferible en alrededor de 0,1 a aproximadamente 0,5 g, y de la forma más preferible en alrededor de 0,05 a aproximadamente 0,2 g por g de enzima(s) celulolítica.

[0192] En los métodos de la presente invención, la composición enzimática puede comprender cualquier proteína implicada en el procesamiento de un material con celulosa a glucosa, o hemicelulosa a xilosa, manosa, galactosa, y arabinosa, sus polímeros, o productos derivados de éstos como se describe abajo.

En un aspecto, la composición enzimática comprende una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

En otro aspecto, la composición enzimática otro o incluso comprende además uno o varias actividades enzimáticas adicionales para mejorar la degradación del material con celulosa.

Enzimas adicionales preferidas son xilanasas, hemicelulasas, esterases (por ejemplo, lipasas, fosfolipasas, y/o cutinasas), proteasas, lacasas, peroxidasas, o mezclas derivadas.

[0193] La composición enzimática puede ser una preparación monocomponente, por ejemplo, una endoglucanasa, una preparación de varios componentes, por ejemplo, endoglucanasa, celobiohidrolasa, glucosidasa beta, o una combinación de preparaciones de proteína de varios componentes y monocomponente.

Las proteínas celulolíticas pueden tener actividad, es decir, hidrolizar celulosa, bien en la gama de pH ácido, neutral, o alcalino.

[0194] Uno o varios componentes de la composición enzimática pueden ser un componente recombinante, es decir, producido por clonación de una secuencia de ADN que codifica el componente único y célula subsecuente transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (ver, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244).

El huésped es preferiblemente un huésped heterólogo (enzima es extranjera a huésped), pero el huésped puede bajo ciertas condiciones también ser un huésped homólogo (enzima es nativa a huésped).

Proteínas celulolíticas monocomponentes también se puede preparar por purificación de tal proteína de un caldo de fermentación.

[0195] Las enzimas usadas en la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para usar en los procesos descritos aquí, tal como, por ejemplo, un caldo de fermentación crudo con o sin células, un polvo seco o granulado, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida.

Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tal como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico según proceso establecido.

[0196] Un polipéptido con actividad enzimática celulolítica puede ser un polipéptido bacteriano.

Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *estafilococo*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, u polipéptido de *Oceanobacillus* con actividad enzimática celulolítica, o un polipéptido bacteriano Gram negativo tal

como un *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *helicobacteria*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, o *Ureaplasma* con actividad enzimática celulolítica.

[0197] 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 enzimática celulolítica.

[0198] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* con actividad enzimática celulolítica.

[0199] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans* con actividad enzimática celulolítica.

[0200] El polipéptido con actividad enzimática celulolítica 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 polipéptido de *Yarrowia* con actividad de enzima celulolítica; o de forma más preferible un polipéptido fúngico filamentoso tal como un *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*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromices*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizofilum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Termoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria* con actividad enzimática celulolítica.

[0201] 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 enzimática celulolítica.

[0202] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *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*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcocroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, or *Trichophaea saccata* con actividad enzimática celulolítica.

[0203] Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína de proteínas celulolíticas también puede ser usados.

[0204] Ejemplos de preparaciones de proteína celulolítica comercial adecuados para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLIC™ Ctec (Novozymes A/S), CELLULAST™ (Novozymes A/S), y NOVOZYM™ 188 (Novozymes A/S).

Otras preparaciones disponibles comercialmente que comprenden celulasa que se pueden utilizar incluyen CELLUZYME™, CEREFLO™ y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAMINEX™ y SPEZYME™ CP (Genencor Int.), W de ROHAMENT™ 7069 (Röhm GmbH), y FIBREZYME® LDI, FIBREZYME® LBR, o VISCOSTAR® 150L (Dyadic internacional, Inc., Júpiter, FL, EEUU).

Las enzimas de celulasa se agregan en cantidades de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 5,0 % en peso de sólidos, de forma más preferible de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 4,0% en peso de sólidos, y de la forma más preferible de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 2,0% en peso de sólidos.

[0205] Ejemplos de endoglucanasas bacterianas que se pueden usar en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, un *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanasa (WO 91/05039 ; WO 93/15186 ; U.S. Patent No. 5,275,944 ; WO 96/02551 ; U.S. Patent No. 5,536,655 , WO 00/70031, WO 05/093050); *Thermobifida fusca* endoglucanasa III (WO 05/093050); y *Thermobifida fusca* endoglucanasa V (WO 05/093050).

[0206] Ejemplos de endoglucanasas fúngicas que se pueden usar en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, una *Trichoderma reesei* endoglucanasa I (Penttilä et al., 1986, gen 45: 253-263; número de acceso GENBANK™

M15665); *Trichoderma reesei* endoglucanasa II (Saloheimo, et al., 1988, gen 63:11-22; número de acceso GENBANK™. M19373); *Trichoderma reesei* endoglucanasa III (Okada et al., 1988, Appl. Environ. Microbiol. 64: 555-563; GENBANK™ n° de acceso AB003694); *Trichoderma reesei* endoglucanasa IV (Saloheimo et al., 1997, Eur. J. Biochem. 249: 584-591; GENBANK™ n° de acceso Y11113); y *Trichoderma reesei* endoglucanasa V (Saloheimo et al., 1994, Molecular Microbiology 13: 219-228; GENBANK™ n° de acceso Z33381); *Aspergillus aculeatus* endoglucanasa (Ooi et al., 1990, Nucleic Acids Research 18: 5884); *Aspergillus kawachii* endoglucanasa (Sakamoto et al., 1995, Current Genetics 27: 435-439); *Erwinia carotovora* endoglucanasa (Saarilahti et al., 1990, Gene 90: 9-14); *Fusarium oxysporum* endoglucanasa (GENBANK™ n° de acceso L29381); *Humicola grisea* var. *thermoidea* endoglucanasa (GENBANK™ n° de acceso AB003107); *Melanocarpus albomyces* endoglucanasa (GENBANK™ n° de acceso MAL515703); *Neurospora crassa* endoglucanasa (GENBANK™ n° de acceso XM_324477); *Humicola insolens* endoglucanasa V; *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65 endoglucanasa; *basidiomycete* CBS 495.95 endoglucanasa; *basidiomycete* CBS 494.95 endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6B endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6C endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7C endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7E endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7F endoglucanasa; *Cladorrhinum foecundissimum* ATCC 62373 CEL7A endoglucanasa; and *Trichoderma reesei* strain No. VTT-D-80133 endoglucanasa (GENBANK™ n° de acceso M15665).

Ejemplos de celobiohidrolasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Trichoderma reesei* celobiohidrolasa I; *Trichoderma reesei* celobiohidrolasa II; *Humicola insolens* celobiohidrolasa I, *Myceliophthora thermophila* celobiohidrolasa II, *Thielavia terrestris* celobiohidrolasa II (CEL6A), *Chaetomium thermophilum* celobiohidrolasa I, and *Chaetomium thermophilum* celobiohidrolasa II.

[0207] Ejemplos de beta-glucosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Aspergillus oryzae* beta-glucosidasa; *Aspergillus fumigatus* beta-glucosidasa; *Penicillium brasilianum* IBT 20888 beta-glucosidasa; *Aspergillus niger* beta-glucosidasa; y *Aspergillus aculeatus* beta-glucosidasa.

[0208] El polipéptido de *Aspergillus oryzae* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según WO 2002/095014.

El polipéptido de *Aspergillus fumigatus* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según WO 2005/047499.

El polipéptido de *Penicillium brasilianum* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según WO 2007/019442.

El polipéptido de *Aspergillus niger* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según Dan et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 4973-4980.

El polipéptido de *Aspergillus aculeatus* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según Kawaguchi et al., 1996, Gene 173: 287-288.

[0209] La beta-glucosidasa puede ser una proteína de fusión.

En un aspecto, la beta-glucosidasa es la proteína de fusión variante BG de beta-glucosidasa de *Aspergillus* o la proteína de fusión de glucosidasa beta de *Aspergillus oryzae* obtenida según WO 2008/057637.

[0210] Otras endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas se describen en numerosas familias de hidrolasa de glicosil que utilizan la clasificación según Henrissat B., 1991, una clasificación de glicosil hidrolasas basada en similitudes de secuencia aminoácida, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat B., y Bairoch un., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0211] Otras enzimas celulolíticas que se pueden usar en la presente invención son descritas en EP 495,257, EP 531,315, EP 531,372, WO 89/09259, WO 94/07998, WO 95/24471, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 96/034108, WO 97/14804, WO 98/08940, WO 98/012307, WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 98/028411, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025846, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2000/009707, WO 2002/050245, WO 2002/0076792, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, patente US n° 4,435,307, patente US n° 5,457,046, patente US n° 5,648,263, patente US n° 5,686,593, patente US n° 5,691,178, patente US n° 5,763,254, y patente US n° 5,776,757.

[0212] Ejemplos de preparaciones comerciales de enzimas degradantes de xilano adecuadas para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, SHEARZYME™ (Novozymes A/S), CELLIC™ Htec (Novozymes A/S), VISCOZYME® (Novozymes A/S), ULTRAFLO® (Novozymes A/S), PULPZYME® HC (Novozymes A/S), MULTIFECT® Xylanase (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 Xylanase (DSM), DEPOL™ 333P (Biocatalysts Limit, Gales, RU), DEPOL™ 740L (Biocatalysts Limit, Gales, RU), and DEPOL™ 762P (Biocatalysts Limit, Gales, RU).

[0213] Ejemplos de xilanasas útil en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Aspergillus aculeatus* xylanasa (GeneSeqP:AAR63790; WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* xilanasas (WO 2006/078256), y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 xilanasas (WO 2009/079210).

[0214] Ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Trichoderma reesei* beta-xylosidasa (UniProtKB/TrEMBL número de acceso Q92458), *Talaromyces emersonii* (SwissProt número de acceso Q8X212), y *Neurospora crassa* (SwissProt número de acceso Q7SOW4).

[0215] Ejemplos de acetilxilano esterasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Hypocrea jecorina* acetilxylan esterasa (WO 2005/001036), *Neurospora crassa* acetilxylan esterasa (UniProt accession number q7s259), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 acetilxylan esterasa (WO 2009/042846), *Chaetomium globosum* acetilxylan esterasa (UniProt accession number Q2GWX4), *Chaetomium gracile* acetilxylan esterasa (GeneSeqP accession number AAB82124), *Phaeosphaeria nodorum* acetilxylan esterasa (UniProt accession number Q0UHJ1), y *Humicola insolens* DSM 1800 acetilxylan esterasa (WO 2009/073709).

[0216] Ejemplos de esterasas de ácido ferúlico útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Humicola insolens* DSM 1800 feruloyl esterasa (WO 2009/076122), *Neurospora crassa* feruloyl esterasa (UniProt número de acceso Q9HGR3), y *Neosartorya fischeri* feruloyl esterasa (UniProt número de acceso A1 D9T4).

[0217] Ejemplos de arabinofuranosidasas útil en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Humicola insolens* DSM 1800 arabinofuranosidasa (WO 2009/073383) y *Aspergillus niger* arabinofuranosidasa (número de acceso de GeneSeqP AAR94170).

[0218] Ejemplos de alfa-glucuronidasas útil en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Aspergillus clavatus* alpha-glucuronidasa (UniProt número de acceso alcc12), *Trichoderma reesei* alpha-glucuronidasa (UniProt número de acceso Q99024), *Talaromyces emersonii* alpha-glucuronidasa (UniProt número de acceso Q8X211), *Aspergillus niger* alpha- glucuronidasa (UniProt número de acceso Q96WX9), *Aspergillus terreus* alpha-glucuronidasa (SwissProt número de acceso Q0CJP9), and *Aspergillus fumigatus* alpha-glucuronidasa (SwissProt número de acceso Q4WW45).

[0219] Las enzimas celulolíticas y proteínas usadas en los métodos de la presente invención se pueden producir por fermentación de las cepas microbianas mencionadas anteriormente en un medio nutritivo que contiene fuentes de nitrógeno y carbono adecuadas y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Bennett, J.W. y LaSure, L. (eds.), More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, CA, 1991).

Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection).

Rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para crecimiento y producción de enzima celulolítica se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Bailey, J.E., and Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

[0220] La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula que da como resultado la expresión o aislamiento de una enzima celulolítica.

Fermentación puede, por lo tanto, entenderse como que comprende cultivo en matraz de agitación, o fermentación a gran o pequeña escala (incluyendo, continuo, lote, lote alimentado, o fermentaciones de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten a la enzima celulolítica ser expresada o aislada.

Las enzimas celulolíticas resultantes producidas por los métodos anteriormente descritos se pueden recuperar del medio de fermentación y purificar por procedimientos convencionales.

[0221] Fermentación. Los azúcares fermentables obtenidos del material celulósico pretratado e hidrolizado se pueden fermentar por uno o varios microorganismos de fermentación capaz de fermentar los azúcares directa o indirectamente en un producto de fermentación deseada. "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprende un paso de fermentación.

Procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación usados en la industria de alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria de cuero, e industria de tabaco.

Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y organismo fermentador y pueden fácilmente ser determinados por un experto en la técnica.

[0222] En el paso de fermentación, azúcares, liberados del material celulósico como resultado del pretratamiento y pasos de hidrólisis enzimática, se fermentan a un producto, por ejemplo, etanol, por un organismo fermentador, tal como levadura.

Hidrólisis (sacarificación) y fermentación pueden ser separadas o simultáneas.

Tales métodos incluyen, pero de forma no limitativa, hidrólisis separada y fermentación (SHF); sacarificación simultánea y fermentación (SSF); sacarificación simultánea y cofermentación (SSCF); hidrólisis híbrida y fermentación (HHF); SHCF (hidrólisis separada y co-fermentación), HHCF (hidrólisis híbrida y fermentación), y conversión microbiana directa (DMC).

5 [0223] Cualquier material celulósico hidrolizado adecuado se puede usar en el paso de fermentación al practicar la presente invención.

10 El material es generalmente seleccionado basado en el producto de fermentación deseada, es decir, la sustancia a ser obtenida de la fermentación, y el proceso empleado, como es bien conocido en la técnica. Ejemplos de sustratos adecuados para usar en los métodos de presente invención incluyen materiales celulósicos, tal como madera o residuos de planta o bajos azúcares moleculares DP1-3 obtenidos de material celulósico procesado que se pueden metabolizar por el microorganismo fermentador, y que se pueden suministrar por adición directa al medio de fermentación.

15 [0224] El término "medio de fermentación" se entiende aquí para referirse a un medio antes de que el microorganismo(s) de fermentación sea adicionado, tal como un medio resultante de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en una sacarificación simultánea y proceso de fermentación (SSF).

20 [0225] "Microorganismos fermentadores" se refiere a cualquier microorganismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación deseado para producir un producto de fermentación.

25 El organismo fermentador puede ser C⁶ y/o C⁵ organismos de fermentación, o combinación de los mismos. Tanto organismos de fermentación C⁶ como C⁵ se conocen en la técnica. Microorganismos de fermentación adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, maltosa, manosa, galactosa, u oligosacáridos, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

[0226] Ejemplos de etanol de producción de organismos de fermentación bacterianos y fúngicos son descritos por Lin et al., 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

30 [0227] Ejemplos de microorganismos de fermentación que pueden fermentar C₆ azúcares incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tal como levadura. Levadura preferida incluye cepas del *Saccharomyces* spp., preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

35 [0228] Ejemplos de organismos de fermentación que pueden fermentar C₅ azúcares incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tales como levadura. Levadura de fermentación C₅ preferida incluyen cepas de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis*, tal como *Pichia stipitis* CBS 5773; cepas de *Candida*, preferiblemente *Candida boidinii*, *Candida brassicae*, *Candida sheatae*, *Candida diddensii*, *Candida pseudotropicalis*, o *Candida utilis*.

40 [0229] Otros organismos de fermentación incluyen cepas de *Zymomonas*, tales como *Zymomonas mobilis*; *Hansenula*, tal como *Hansenula anomala*; *Kluyveromyces*, tal como *K. fragilis*; *Schizosaccharomyces*, tal como *S. pombe*; y *E. coli*, especialmente cepas de *E. coli* que han sido genéticamente modificados para mejorar el rendimiento de etanol.

45 [0230] En un aspecto preferido, la levadura es un *Saccharomyce* spp.
En un aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces distaticus*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces uvarum*.

50 En otro aspecto preferido, la levadura es un *Kluyveromyces*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*.
En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida boidinii*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida brassicae*.

55 En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida diddensii*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida pseudotropicalis*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida utilis*.

En otro aspecto preferido, la levadura es una *Clavispora*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora lusitaniae*.

60 En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora opuntiae*.
En otro aspecto preferido, la levadura es un *Pachysolen*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es *Pachysolen tannophilus*.

En otro aspecto preferido, la levadura es un *Pichia*.
En otro aspecto más preferido, la levadura es un *Pichia stipitis*.
65 En otro aspecto preferido, la levadura es un *Bretannomyces*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Bretanomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

5 [0231] Bacterias que pueden fermentar eficazmente hexosa y pentosa a etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, supra).

[0232] En un aspecto preferido, la bacteria es un *Zymomonas*.

En un aspecto más preferido, la bacteria es *Zymomonas mobilis*.

10 En otro aspecto preferido, la bacteria es un *Clostridium*.

En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Clostridium thermocellum*.

[0233] Levadura disponible comercialmente adecuada para producción de etanol incluye, por ejemplo, Levadura ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE.UU), FALI™ (disponible de Fleischmann's Yeast, EE.UU), SUPERSTART™ y levadura fresca de THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EE.UU), BIOFERM™ AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU), GERT STRAND™ (disponible de Gert Strand AB Suecia), y FERMIOL™ (disponible de DSM Specialties).

[0234] En un aspecto preferido, el microorganismo fermentador ha sido genéticamente modificado para proporcionar la capacidad para fermentar azúcares de pentosa, tal como xilosa y arabinosa utilizando microorganismos, y xilosa y arabinosa co-utilizando microorganismos.

[0235] La clonación de genes heterólogos en varios microorganismos de fermentación ha llevado a la construcción de organismos capaz de convertir hexosas y pentosas a etanol (cofermentación) (Chen and Ho, 1993, Cloning and improving the expression of Pichia stipitis xylose reductase gene in Saccharomyces cerevisiae, Appl.Biochem. Biotechnol. 39-40: 135-147; Ho et al., 1998, Genetically engineered Saccharomyces yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose, Appl. Environ. Kotter and Ciriacy, 1993, Xylose fermentation by Saccharomyces cerevisiae, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 776-783 ; Walfridsson et al., 1995, Xylose-metabolizing Saccharomyces cerevisiae strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase, Appl. Environ. Microbiol. 61: 4184-4190 ; Kuyper et al., 2004, Minimal metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle, FEMS Yeast Research 4: 655-664 ; Beall et al., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant Escherichia coli, Biotech. Bioeng. 38: 296-303 ; Ingram et al., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng. 58: 204-214 ; Zhang et al., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic Zymomonas mobilis, Science 267: 240-243; Deanda et al., 1996, Development of an arabinose-fermenting Zymomonas mobilis strain by metabolic pathway engineering, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4465-4470).

[0236] En un aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Saccharomices cerevisiae*.

En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Zymomonas mobilis*.

En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Escherichia coli*.

En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Klebsiella oxytoca*.

45 [0237] Es bien conocido en la técnica que los organismos anteriormente descritos también pueden usarse para producir otras sustancias, como se describe en este caso.

[0238] El microorganismo fermentador es típicamente añadido a la lignocelulosa degradada o hidrolizada y la fermentación se realiza durante aproximadamente 8 a aproximadamente 96 horas, tal como aproximadamente 24 a aproximadamente 60 horas.

La temperatura es típicamente entre aproximadamente 26°C a aproximadamente 60°C, en particular aproximadamente 32°C o 50°C, y en alrededor de pH 3 a alrededor de pH 8, tal como alrededor de pH 4-5, 6, o 7.

[0239] En un aspecto preferido, la levadura y/o otro microorganismo se aplica a la lignocelulosa degradada o hidrolizada y la fermentación se realiza durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, tal como típicamente 24-60 horas.

En un aspecto preferido, la temperatura es preferiblemente entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, de forma más preferible aproximadamente 25°C a aproximadamente 50°C, y de la forma más preferible aproximadamente 32°C a aproximadamente 50°C, en particular aproximadamente 32°C o 50°C, y el pH es generalmente de alrededor de pH 3 a alrededor de pH 7, preferiblemente alrededor de pH 4-7.

No obstante, algunos, por ejemplo, organismos de fermentación bacterianos tienen temperatura de fermentación óptima más alta.

Levadura u otro microorganismo es preferiblemente aplicado en cantidades de aproximadamente 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de aproximadamente 10^7 a 10^{10} , especialmente aproximadamente 2×10^8 concentración de células viables por ml de caldo de fermentación.

Más orientación en relación con el uso de la levadura para la fermentación se puede encontrar en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (editores K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999).

5 [0240] El proceso más muy usado en la técnica es el proceso de sacarificación simultánea y fermentación (SSF) donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que supone que levadura y enzima son agregadas juntas.

[0241] Para producción de etanol, después de la fermentación el lodo fermentado se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido según los métodos de la invención se pueden usar como, por ejemplo, etanol de combustible, etanol potable, es decir, licores neutrales potables, o etanol industrial.

[0242] Un estimulador de fermentación se puede usar en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos aquí para mejorar adicionalmente el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como, mejora de índice y rendimiento de etanol.

15 Un "estimulador de fermentación" se refiere a estimuladores para crecimiento de los microorganismos de fermentación, en particular, levadura.

Estimuladores de fermentación preferida para crecimiento incluyen vitaminas y minerales.

Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzóico, ácido fólico, riboflavina, y han de vitaminas un, B, C, D, y E. ver, por ejemplo, Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002).

20 Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, y Cu.

25 [0243] Productos de fermentación: un producto de fermentación pueden ser cualquier sustancia derivada de la fermentación.

El producto de fermentación puede ser, sin limitación, un alcohol (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, propanodiol de 1,3, sorbitol, y xilitol); un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diketo-D-gluconico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, 3- ácido hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico, y ácido xilónico); una cetona (por ejemplo, acetona); un aminoácido (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); y un gas (por ejemplo, metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂), y monóxido de carbono (CO)).

El producto de fermentación puede también ser proteína como un producto de valor alto.

35 [0244] El producto de fermentación puede ser un alcohol.

Se entiende que el término "alcohol" abarca una sustancia que contiene una o varias fracciones de hidroxilo.

El alcohol puede ser arabinitol.

El alcohol puede ser butanol.

40 El alcohol puede ser etanol.

El alcohol puede ser glicerol.

El alcohol puede ser metanol.

El alcohol puede ser 1,3-propanediol.

El alcohol puede ser sorbitol.

45 El alcohol puede ser xilitol.

Ver, por ejemplo, Gong, C. Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207- 241 ; Silveira, M. M., and Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408 ; Nigam, P., and Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124 ; Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.

[0245] El producto de fermentación puede ser un ácido orgánico.

55 El ácido orgánico puede ser acético ácido.

El ácido orgánico puede ser ácido acetónico.

El ácido orgánico puede ser ácido adípico.

El ácido orgánico puede ser ácido ascórbico.

El ácido orgánico puede ser ácido cítrico.

60 El ácido orgánico puede ser ácido 2,5-diketo-D-gluconico.

El ácido orgánico puede ser ácido fórmico.

El ácido orgánico puede ser ácido fumárico.

El ácido orgánico puede ser ácido glucárico.

El ácido orgánico puede ser ácido glucónico.

65 El ácido orgánico puede ser ácido glucurónico.

El ácido orgánico puede ser ácido glutárico.

El ácido orgánico puede ser ácido 3-hidroxypropionico.

El ácido orgánico puede ser ácido itacónico.

El ácido orgánico puede ser ácido láctico.

El ácido orgánico puede ser ácido málico.

5 El ácido orgánico puede ser ácido malónico.

El ácido orgánico puede ser ácido oxálico.

El ácido orgánico puede ser ácido propiónico.

El ácido orgánico puede ser ácido succínico.

El ácido orgánico puede ser ácido xilónico.

10 Ver, por ejemplo, Chen, R., and Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65: 435-448.

[0246] El producto de fermentación puede ser una cetona.

Se entiende que el término "cetona" abarca una sustancia que contiene una o varias fracciones de cetona.

15 En otro aspecto más preferido, la cetona es acetona.

Ver, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, supra.

[0247] El producto de fermentación puede ser un aminoácido.

El ácido orgánico puede ser ácido aspártico.

20 El aminoácido puede ser ácido glutámico.

El aminoácido puede ser glicina.

El aminoácido puede ser lisina.

El aminoácido puede ser serina.

El aminoácido puede ser treonina.

25 Ver, por ejemplo, Richard, A., and Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, Biotechnology and Bioengineering 87 (4): 501-515.

[0248] El producto de fermentación puede ser un gas.

El gas puede ser metano.

30 El gas puede ser H₂.

El gas puede ser CO₂.

El gas puede ser CO.

Ver, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya, and K. Kiriya, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, Waster Science and Technology 36 (6-7): 41-47 ; and

35 Gunaseelan V.N. in Biomass and Bioenergy, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.

[0249] Recuperación. El producto(s) de fermentación puede ser opcionalmente recuperado del medio de fermentación que utiliza cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación, o extracción.

40 Por ejemplo, alcohol es separado del material celulósico fermentado y purificado por métodos convencionales de destilación.

Etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 vol.% puede ser obtenido, que se puede usar como, por ejemplo, etanol de combustible, etanol potable, es decir, licores neutrales potables, o etanol industrial.

45 Composiciones detergentes

[0250] Los polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica de la presente invención se pueden adicionar a y así convertirse en un componente de una composición de detergente.

50 [0251] La composición de detergente de la presente invención puede ser formulada, por ejemplo, comocomposición de detergente para ropa de máquina o a mano que incluye una composición de aditivo de lavandería adecuado para pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante adicionado de enjuague, o ser formulado como una composición de detergente para usar en operaciones de limpieza de superficie dura de casa generales, o ser formulado para operaciones delavado de la vajilla a máquina o a mano.

[0252] En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo de detergente que comprende un polipéptido de la invención.

60 El aditivo de detergente al igual que la composición de detergente puede comprender una o varias enzimas tal como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanas, oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o peroxidasa.

[0253] En general las propiedades de la enzima(s) seleccionada deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la enzima(s) debería ser presente en cantidades eficaces.

65

[0254] Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína son incluidos.

Celulasas adecuadas incluyen celulasas del géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0255] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutrales con beneficios de cuidado de color.

Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940.

Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0256] Celulasas disponibles comercialmente incluyen CELLUZYME™, y CAREZYME™ (Novozymes A/S), CLAZINASE™, y HA™ de PURADAX (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0257] Proteasas: proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal u microbiano.

Origen microbiano es preferido.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína son incluidos.

La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa tipo tripsina.

Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente aquellas derivados de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina *Carlsberg*, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en WO 89/06279).

Ejemplos de proteasas tipo tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0258] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, y 274.

[0259] Enzimas proteásicas disponibles comercialmente preferidas incluyen ALCALASE™, SAVINASE™, PRIMASE™, DURALASE™, ESPERASE™, y KANNASE™ (Novozymes A/S), MAXATASE™, MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™, PURAFECT™, OXP™ PURAFECT, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.).

[0260] Lipasas: lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína son incluidos.

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

[0261] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

[0262] Enzimas de lipasa preferidas disponible comercialmente incluyen LIPOLASE™ y LIPOLASE ULTRA™ (Novozymes A/S).

[0263] Amilasas: amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína son incluidos.

Amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrito con más detalle en GB 1,296,839.

[0264] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444.

[0265] Amilasas disponibles comercialmente son DURAMYL™, TERMAMYLà, FUNGAMYL™ y BAN™ (Novozymes A/S), RAPIDASE™ y PURASTAR™ (de Genencor International Inc.).

[0266] Peroxidasas/oxidasas: peroxidasas/oxidasas adecuada incluyen aquellas de origen de planta, bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína son incluidos.

Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

[0267] Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen GUARDZYME™ (Novozymes A/S).

[0268] La enzima(s) detergente se puede incluir en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o varias enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas.

Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado, por ejemplo, como un granulado, líquido, lodo, etc. Formulaciones de aditivo de detergente preferidas son granulados, en particular granulados no polvorientos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones acuosas.

[0269] Granulados no polvorientos se pueden producir, por ejemplo, como descritos en US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden opcionalmente ser recubiertos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de recubrimiento ceroso de materiales son productos poli(etileno óxido) (polietilenglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados con de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohólico contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos.

Ejemplos de recubrimiento que forman películas de materiales adecuados para aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591.

Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizados añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos.

Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.

[0270] La composición de detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una tableta, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido.

Un detergente líquido puede ser acuoso, con típicamente hasta 70% agua y 0-30% solvente orgánico, o no acuoso.

[0271] La composición de detergente comprende uno o varios surfactantes, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolar y/o aniónico y/o catiónico y/o zwitteriónico.

Los surfactantes están típicamente presentes a un nivel de 0,1 % a 60% en peso.

[0272] Cuando se incluye ahí el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un tensioactivo aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido graso alfa-sulfo, ácido alquil- o alquenilsuccínico, o jabón.

[0273] Cuando se incluye ahí el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un tensioactivo no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de alquilo de polihidroxi, o derivados de N-alquilo de N-acilo de glucosamina ("glucamidas").

[0274] El detergente puede contener 0-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético, ácido dietilenotriaminopentaacético, ácido alquil- o alquenilsuccínico, silicatos solubles, o silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst).

[0275] El detergente puede comprender uno o varios polímeros.

Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidone), poli (etilenglicol), poli (alcohol vinílico), poli(vinilpiridine-N-óxido), poli(vinilimidazole), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico, y copolímeros de ácido metacrilato/acrílico de lauril.

[0276] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiletlenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato.

Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, de tipo amida, imida, o sulfona.

[0277] La enzima(s) de la composición de detergente de la invención se puede estabilizar usando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido borónico de fenilo tal como ácido borónico de 4-formilfenilo, y la composición se puede formular como se describe, por ejemplo, en WO 92/19709 y WO 92/19708.

[0278] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como, por ejemplo, acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes

anticorrosivos, agentes de suspensión de tierra, agentes antiredeposición de suciedad, colorantes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótrofos, inhibidores de decoloración, o perfumes.

5 [0279] En las composiciones detergentes, cualquier enzima se puede adicionar en una cantidad que corresponde con 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

10 [0280] En las composiciones detergentes, un polipéptido de la presente invención con actividad mejoradora celulolítica se puede adicionar en una cantidad que corresponde con 0,001-100 mg de proteína, preferiblemente 0,005-50 mg de proteína, de forma más preferible 0,01-25 mg de proteína, incluso de forma más preferible 0,05- 10 mg de proteína, de la forma más preferible 0,05-5 mg de proteína, e incluso de la forma más preferible 0,01-1 mg de proteína por litro de solución de lavado.

15 [0281] Un polipéptido de la invención con actividad mejoradora celulolítica también se puede incorporar en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202.

Péptido señal

20 [0282] Descrito es un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal que comprende o consiste en aminoácidos 1 a 25 de SEC ID n°: 2.

También se describen constructos de ácidos nucleicos que comprenden un gen que codifica una proteína, donde el gen es operativamente enlazado a tal polinucleótido que codifica un péptido señal que comprende o consiste en aminoácidos 1 a 25 de SEC ID n°: 2, donde el gen es extraño al polinucleótido.

25 [0283] La secuencia de polinucleótidos comprende o consiste en nucleótidos 1 a 75 de SEC ID n°: 1.

[0284] La presente invención es posteriormente descrita por los siguientes ejemplos que no deberán ser interpretada como limitación del ámbito de la invención.

30 Ejemplos

Cepa

35 [0285] *Penicillium* sp. NN051602 fue usado como la fuente del polipéptido GH61 con actividad mejoradora celulolítica.
Cepa de *Aspergillus oryzae* HowB101 (WO 95/35385) fue usado como un huésped para expresión de recombinación del polipéptido *Penicillium* sp. GH61 con actividad mejoradora celulolítica.

40 Medios

[0286] Placas PDA fueron compuestas de 39 gramos de agar de dextrosa de patata y agua desionizada a 1 litro.

45 [0287] Medio NNCYP-PCS fue compuesto por litro de 5,0 g de NaNO₃, 3,0 g de NH₄Cl, 2,0 g de MES, 2,5 g de ácido cítrico, 0,2 g de CaCl₂ · 2H₂O, 1,0 g de bacto-peptona, 5,0 g de extracto de levadura, 0,2 g de MgSO₄ · 7H₂O, 4,0 g de K₂ HPO₄, 1,0 ml de solución de oligoelementos de COVE, 2,5 g de glucosa, 25,0 g de rastrojos de maíz pretratados (PCS), y agua desionizada a 1 litro.

50 [0288] Solución de oligoelementos de COVE fue compuesto por 0,04 g de Na₂ B₄ O₇ · 10H₂O, 0,4 g de CuSO₄ · 5H₂O, 1,2 g de FeSO₄ · 7H₂O, 0,7 g de MnSO₄ · H₂O, 0,8 g de Na₂ MoO₄ · 2H₂O, 10 g de ZnSO₄ · 7H₂O, y agua desionizada a 1 litro.

[0289] Medio YPM fue compuesto por 1% extracto de levadura, 2% bacto-peptona, y 2% maltosa.

55 [0290] Placas de medio mínimo fueron compuestas de 6 g de NaNO₃, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH₂PO₄, 1 ml de solución de metales traza de COVE, 20 g de agar noble, 20 ml de 50% glucosa, 2,5 ml de 20% MgSO₄ · 7H₂O, 20 ml de solución madre de biotina, y agua desionizada a 1 litro.

[0291] Solución madre de biotina fue compuesta por 0,2 g de biotina y agua desionizada a 1 litro.

60 [0292] Solución de metales traza de COVE fue compuesto por litro de 0,04 g de Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 0,4 g de CuSO₄ · 5H₂O, 1,2 g de FeSO₄ · 7H₂O, 0,7 g de MnSO₄ · H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₄ · H₂O, 10 g de ZnSO₄ · 7H₂O y agua desionizada a 1 litro.

65 Ejemplo 1: preparación de *Penicillium* sp. micelios de cepa para Extracción de ARN total

[0293] Una muestra de compost fue recogido de Yunnan, China.

Penicillium sp. NN051602 fue aislado utilizando técnicas de aislamiento de espora única en placas PDA a 45°C.

El *Penicillium* sp. cepa fue inoculado sobre una placa PDA e incubado durante 4 días a 45°C en el oscuridad.

Diferentes tapones micelios-PDA fueron inoculados en frascos de 500 ml de agitación que contienen 100 ml de medio NNCYP-PCS.

Los matraces fueron incubados durante 6 días a 45°C con agitación a 160 r.p.m.

Los micelios fueron recogidos a día 4, día 5, y día 6.

Luego los micelios de cada día fueron combinado y congelados en el nitrógeno líquido, y luego almacenados en un congelador a -80°C hasta su uso.

Ejemplo 2: preparación de *Penicillium* sp. cepa ARN

[0294] Los micelios congelados fueron transferidos en un mortero y mano preenfriados de nitrógeno líquido y machacado hasta ser un polvo fino.

ARN total fue obtenido a partir de los micelios en polvo por extracción con Reactivo de TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, aprox, EE.UU) y purificado utilizando un equipo Mini de RNEASY® (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU) según el protocolo del fabricante.

Cinquenta microgramos de ARN total fueron sometidos a secuenciación como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 3: Ensamblaje y minería de secuencia

[0295] ARN total enriquecido para secuencias poliA con el protocolo mRNASeq fue ordenado utilizando un sistema ILLUMINA® GA2 (Illumina, Inc., San Diego, CA, EEUU).

Las lecturas de pareja base raw 36 fueron ensambladas con un ensamblador doméstico.

Las secuencias ensambladas fueron analizadas utilizando métodos de bioinformática estándar para hallazgo y predicción funcional de gen.

ESTScan 2.0 fue usado para predicción de gen.

NCBI blastall versión 2.2.10 y HMMER versión 2.1.1 fueron usados para predecir función basada en homología estructural.

El candidato familia GH61 fue identificado directamente por análisis de los resultados de explosión.

Ejemplo 4: preparación de ADN genómico *Penicillium* sp. NN051602

[0296] *Penicillium* sp. NN051602 fue cultivado en una placa PDA a 45°C durante 3 días.

Micelios fueron recogidos directamente de la placa de agar en un mortero esterilizado y congelado bajo nitrógeno líquido.

Micelios congelados fueron machacados, por mortero y mano de mortero, hasta ser un polvo fino, y ADN genómico fue aislado utilizando un equipo DNEASY® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EEUU).

Ejemplo 5: clonación del gen *Penicillium* sp. GH61 de ADN genómico

[0297] Basado en la Información de secuenciación de ILLUMINA® del *Penicillium* sp.

Gen GH61 obtenido en el ejemplo 3, cebadores oligonucleótidos, mostrado por debajo, fueron diseñados para amplificar el gen de polipéptido GH61 de ADN genómico de *Penicillium* sp. NN051602.

Un IN-FUSION® CF Dry-down Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EEUU) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pPFJO355, sin la necesidad de digestión de restricción y ligamiento.

Cebador de sentido:

5'-ACACAACTGGGGATCCACCATGCTGTCTTCGACGACTCGCA-3' (SEC ID n°: 3)

Cebador antisentido:

5'-GTCACCCTCTAGATCTCGACTTCTTCTAGAACGTCGGCTCA-3' (SEC ID N°: 4)

Letras en negrita representaron la secuencia codificante y la secuencia restante fue homóloga a sitios de inserción de pPFJO355.

[0298] El vector de expresión pPFJO355 contiene el promotor de TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*, elementos de terminador de *Aspergillus niger* glucoamilasa, secuencias derivadas pUC19 para selección y propagación en el *E. coli*, y un gen *pyrG*, que codifica una decarboxilasa de orotidina de *Aspergillus nidulans* para selección de un transformante de una cepa *pyrG* de *Aspergillus* mutante.

[0299] Veinte picomoles de cada uno de los cebadores arriba fueron usados en una reacción por PCR compuesta por *Penicillium* sp.

NN051602 ADN genómico, 10 µl de 5X GC de búfer (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 1,5 µl de DMSO, 2,5 mM cada uno de dATP, dTTP dGTP, y dCTP, y 0,6 unidad de polimerasa dPHUSION™ High- Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) en un volumen final de 50 µl.

La amplificación fue realizada utilizando un Peltier Thermal Cycler (M J Research Inc., South San Francisco, CA, EEUU) programado para desnaturalizar a 98°C durante 1 minutos; 5 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 15

segundos, recocimiento a 63°C durante 30 segundos, con un aumento de 1°C por ciclo y alargamiento a 72°C durante 60 segundos; 25 ciclos cada uno a 98°C durante 15 segundos y 72°C durante 60 segundos; y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

El bloque de calor pasó entonces a un ciclo 4°C mojado.

[0300] Los productos reactivos fueron aislados por 1,0% electroforesis en gel de agarosa usando 90 mM Tris-borate y búfer 1 mM EDTA (TBE) donde aproximadamente una banda de producto 0,9 kb fue cortados del gel, y purificada utilizando un equipo ILLUSTRATE® GFX® PCR DNA y Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) según las instrucciones del fabricante.

[0301] Plásmido pPFJO355 fue digerido con Bam I y Bgl II, aislado por 1,0% electroforesis en gel de agarosa usando TBE búfer, y purificado utilizando un equipo ILLUSTRATE® GFX® PCR DNA y Gel Band Purification Kit según las instrucciones del fabricante.

[0302] El fragmento de gen y el vector digerido fueron ligados utilizando un equipo IN- FUSION® CF Dry-down PCR Cloning Kit dando como resultado pGH61D23Y4 (figura 1) donde transcripción del *Penicillium* sp.

Gen GH61 estaba bajo el control del promotor de TAKA-alfa-amilasa *Aspergillus oryzae*.

En resumen, 30 ng de pPFJO355 digerido con Bam I y Bgl II, y 60 ng del *Penicillium* sp.

Producto PCR purificado de gen GH61 fue adicionado a un frasco de reacción y resuspendido en un volumen final de 10 µl con adición de agua desionizada.

La reacción fue incubada a 37°C durante 15 minutos y luego 50°C durante 15 minutos.

Tres µl de la reacción fueron usados para transformar células competentes *E. coli* TOP10 (TIANGEN Biotech Co. Ltd., Pekín, China).

Un transformante de *E. coli* que contiene pGH61 D23Y4 fue detectado por colonia PCR y ADN plásmido se preparó utilizando un equipo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EEUU).

La inserción de gen *Penicillium* sp. GH61 en pGH61 D23Y4 fue confirmada por secuenciación del ADN que utiliza un analizador de ADN 3730XL (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, EEUU).

[0303] El mismo fragmento de PCR fue clonado en el vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) utilizando un Sistema de vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) para generar pGEM-T-GH61D23Y4.

La inserción de gen *Penicillium* sp. GH61 en pGEM-T-GH61 D23Y4 fue confirmada por secuenciación del ADN que utiliza un analizador de ADN 3730XL.

E. cepa coli T-51602 *E. coli* designado NN059154, que contiene pGEM-T-GH61D23Y4, fue depositado con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania el 26 agosto 2009 y número de registro asignado DSM 22882.

Ejemplo 6: caracterización de la secuencia genómica *Penicillium* sp. que codifica un polipéptido GH61A con actividad de mejora celulolítica

[0304] Secuenciación del ADN del clon genómico *Penicillium* sp. que codifica un polipéptido GH61A con actividad de mejora celulolítica fue realizada con un secuenciador Applied Biosystems Model 3700 Automated DNA Sequencer usando química de terminador BIG-DYE™ versión 3,1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EEUU) y química de dGTP (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EEUU) y estrategia de walking de cebador.

La calidad de los datos de secuencia de nucleótidos fue escrutinados y todas secuencias fueron comparadas entre sí con asistencia de PHRED/PHRAP software (University of Washington, Seattle, WA, EEUU).

[0305] La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº: 1) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº: 2) del *Penicillium* sp. gen gh61a se muestran en la figura 2.

La secuencia codificante es 835 bp con el codón de terminación y se interrumpe por un intrón de 73 bp (nucleótidos 114-186).

La proteína predicha codificada es 253 aminoácidos.

El %G+C de la secuencia codificante del gen (incluyendo intrones) es 63.35% G+C y la secuencia codificante de polipéptido maduro es 64.62%.

Usando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 25 residuos fue predicho.

La proteína madura predicha contiene 228 aminoácidos con una masa molecular predicha de 24.33 kDa y un punto isoelectrónico de 4.17.

[0306] Un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos fue determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol.

Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa Needle de EMBOSS con penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y la matriz EBLOSUM62.

La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *penicillium* que codifica el polipéptido GH61A con actividad de mejora celulolítica comparte 74% identidad (excluyendo espacios) a la secuencia de

aminoácidos deducida de una proteína de familia GH61 predicha de *Thermoascus aurantiacus* (GENESEQP:AUM17198).

Ejemplo 7: expresión de gen *Penicillium* sp. GH61A en el *Aspergillus oryzae*

[0307] Protoplastos *Aspergillus oryzae* HowB101 (WO 95/35385 Ejemplo 1) fueron preparados según el método de Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422 y transformados con 3 µg de pGH61 D23Y4.

La transformación liberó aproximadamente 50 transformantes.

Doce transformantes fueron aislados a placas de medio mínimo individuales.

[0308] Seis transformantes fueron inoculados separadamente en 3 ml de medio YPM en una placa de 24 pocillos e incubados a 30°C, 150 r.p.m.

Tras tres días de incubación, 20 µl de sobrenadante de cada cultivo fueron analizado en un Novex de nuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel con ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico (MES) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

El gel resultante fue manchado con INSTANT® Blue (Expedeon Ltd., Babraham Cambridge, RU).

Péfiles SDS-PAGE de los cultivos mostraron que la mayoría de los transformantes tenían una banda mayor de aproximadamente 45 kDa.

La cepa de expresión fue designada *Aspergillus oryzae* EXP03089.

[0309] Un oblicuo de *Aspergillus oryzae* EXP03089 fue lavado con 10 ml de medio YPM e inoculado en un matraz de 2 litros que contenía 400 ml de medio YPM para generar caldo para caracterización de la enzima.

El cultivo fue cosechado en el día 3 y filtrado utilizando una membrana 0,45 µm DURAPORE Membrane (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

Ejemplo 8: purificación de polipéptido *Penicillium* recombinante sp. GH61 con actividad mejoradora celulolítica de *Aspergillus oryzae*

[0310] Un 400 ml volumen del caldo filtrado de la cepa recombinante *Aspergillus oryzae* EXP03089 fue precipitado con sulfato amónico (80% saturación) y redissuelto en 20 ml de 25 mM acetato sódico pH 5,0 búfer, y luego dializado contra el mismo búfer y filtrado a través de un filtro 0,45 mm.

La solución fue aplicada a una columna de 30 ml Q SEPHAROSE® Fast Flow (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) equilibrada en 25 mM acetato sódico pH 5,0.

La proteína GH61 recombinante fue eluida con un Gradiente lineal de NaCl (0-0,4 M).

Fracciones eluidas con 0,1- 0,2 M NaCl fueron recogidas y dializadas contra el mismo búfer de equilibrado.

La muestra fue además purificada en una columna MONO Q® (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) con un gradiente lineal de NaCl (0-0,3 M).

Fracciones fueron evaluadas por SDS-PAGE.

Fracciones con una banda de aproximadamente 45 kDa fueron agrupadas.

La solución agrupada fue concentrada por ultrafiltración.

Ejemplo 9: hidrólisis de rastrojos de maíz pretratados por polipéptido *Penicillium* sp. con actividad mejoradora celulolítica

[0311] Caldo de cultivo se preparó como se describe en el ejemplo 7 y se concentró aproximadamente 20-fold utilizando un dispositivo de ultrafiltración de Amicon (Millipore, Bedford, MA, EE.UU, 10 kDa membrana de polietersulfona, 40 psi, 4°C).

Concentración de proteína fue estimada por densitometría siguiente SDS-PAGE y coloración de azul Coomassie.

Rastrojo de maíz fue pretratado y preparado como un sustrato de ensayo como se describe en WO 2005/074647 para generar forraje de maíz pretratado (PCS).

La mezcla de celulasa de base usada para evaluar mejora de actividad fue obtenida a partir de cepa de *Trichoderma reesei* SMA135 (WO 2008/057637).

[0312] Hidrólisis de PCS fue conducida usando placas de pocillos de 1,6 ml de profundidas (Axygen, Santa Clara, aprox, EE.UU) utilizando un volumen de reacción total de 1,0 ml y una concentración PCS de 50 mg/ml en 1 mM manganeso sulfato-50 mM acetato sódico, pH 5,0.

El polipéptido *Penicillium* sp. GH61 fue añadido por separado a la mezcla de celulasa de base a concentraciones que varían de 0 a 100% de la concentración de proteína de la mezcla de celulasa de base.

Incubación fue a 50°C durante 72 horas.

Ensayos fueron realizados por triplicado.

Partes alícuotas fueron centrifugadas, y el líquido sobrenadante fue filtrado por centrifugado (MULTISCREEN® HV 0.45 µm, Millipore, Billerica, MA, EE.UU) a 3000 r.p.m. durante 10 minutos usando un centrifugador de placa (SSORVALL® RT7, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

Cuando no usadas inmediatamente, partes alícuotas de hidrolizado filtrado fueron congeladas a -20°C.

Concentraciones de azúcar de muestras diluidas en 0,005 M H₂SO₄ con 0,05% p/p ácido benzoico fueron medidas tras la elución por 0,005 M H₂SO₄ con 0,05% p/p ácido benzoico a una velocidad de flujo de 0,6 ml/minuto de una

columna 4,6 x 250 mm AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU) a 65°C con cantidad por integración de glucosa y señales de celobiosa de detección de índice de refracción (CHEMSTATION®, AGILENT® 1100 HPLC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) calibrado por muestras de azúcar puro (Absolute Standards Inc., Hamden, CT, EEUU).

5 Los equivalentes resultantes fueron usados para calcular el porcentaje de conversión de celulosa para cada reacción.

El grado de conversión de celulosa a glucosa más azúcares de celobiosa (conversión; %) fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Conversión (\%)} = (\text{glucosa} + \text{celobiosa} \times 1.053) (\text{mg/ml}) \times 100 \times 162 / (\text{Celulosa (mg/ml)} \times 180) = (\text{glucosa} + \text{celobiosa} \times 1.053) (\text{mg/ml}) \times 100 / (\text{Celulosa (mg/ml)} \times 1.111)$$

10 En esta ecuación el factor 1.111 refleja el aumento de peso en la celulosa de conversión a glucosa, y el factor 1.053 refleja el aumento de peso en la celobiosa de conversión a glucosa.

Celulosa en PCS fue determinada por una asimilación de límite de PCS para liberar glucosa y celobiosa.

15 [0313] Los resultados de adición cantidades en aumento de polipéptido *Penicillium* sp. GH61 a la mezcla de celulosa de base se muestran en figura 3. Añadir polipéptido *Penicillium* sp. GH61 proporcionó un factor de estimulación de 1,29 a un nivel de adición 100%.

Depósito de Material Biológico

20 [0314] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, y se les ha dado el siguiente número de acceso:

Depósito	Número de Acceso	Fecha de depósito
<i>E. coli</i> (NN059154)	DSMZ 22882	26 agosto 2009

25 [0315] La cepa se ha depositado en condiciones que aseguren que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente a uno determinado por las leyes de patentes extranjeras para tener derecho a la misma.

El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada.

30 El depósito está disponible según sea necesario por leyes de patente extranjeras en países donde duplicados de la aplicación sujeta, o su progenie son solicitados.

Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto en derogación de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental.

Listado de secuencias

35 [0316]

<110> Novozymes, Inc. Novozymes A/S Tang, Lan Liu, Ye Duan, Junxin Zhang, Yu Jorgensen, Christian I Kramer, Randall

40 <120> Polipéptidos con actividad mejoradora celulolítica y polinucleótidos que los codifican

<130> 11634-WO-PCT

45 <150> US 61/246,893

<151> 2009-09-29

<160> 4

50 <170> Versión de patentIn 3.5

<210> 1

<211> 835

<212> ADN

55 <213> *Penicillium* sp.

<400> 1

atgctgtctt cgacgactcg caccctcgcc ttacaggcc ttgcgggcct tctgtccgct	60
cccctgggtca aggcccatgg ctttgtccag ggcattgtca tcggtgacca attgtaagtc	120
cctctcttgc agttctgtcg attaactgct ggactgcttg cttgactccc tgctgactcc	180
caacagctac agcgggtaca tcgtcaactc gttcccctac gaatccaacc cccccccgt	240
catcggctgg gccacgaccg ccaccgacct gggcttcgtc gacggcacag gataccaagg	300
cccggacatc atctgccacc ggaatgcgac gcccgcgccg ctgacagccc ccgtggccgc	360
cggcggcacc gtcgagctgc agtggacgcc gtggccggac agccaccacg gaccgctcat	420
cacctacctg gcgccgtgca acggcaactg ctcgaccgtc gacaagacga cgctggagtt	480
cttcaagatc gaccagcagg gcctgatcga cgacacgagc ccgccgggca cctgggcgtc	540
ggacaacctc atcgccaaca acaatagctg gaccgtcacc attccaaca gcgtcgcccc	600
cggcaactac gtcctgcgcc acgagatcat cgccctgcac tcggccaaca acaaggacgg	660
cgcccagaac tacccccagt gcatcaacat cgaggtcacg ggcggcggct ccgacgcgcc	720
tgagggtact ctgggcgagg atctctacca tgacaccgac ccgggcattc tggtcgacat	780
ttacgagccc attgcgacgt ataccattcc ggggccgcct gagccgacgt tctag	835

<210> 2

<211> 253

<212> PRT

5 <213> *Penicillium* sp.

<400> 2

Met	Leu	Ser	Ser	Thr	Thr	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Thr	Gly	Leu	Ala	Gly	1	5	10	15
Leu	Leu	Ser	Ala	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His	Gly	Phe	Val	Gln	Gly	Ile	20	25	30	
Val	Ile	Gly	Asp	Gln	Phe	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Ile	Val	Asn	Ser	Phe	Pro	35	40	45	
Tyr	Glu	Ser	Asn	Pro	Pro	Pro	Val	Ile	Gly	Trp	Ala	Thr	Thr	Ala	Thr	50	55	60	
Asp	Leu	Gly	Phe	Val	Asp	Gly	Thr	Gly	Tyr	Gln	Gly	Pro	Asp	Ile	Ile	65	70	75	80
Cys	His	Arg	Asn	Ala	Thr	Pro	Ala	Pro	Leu	Thr	Ala	Pro	Val	Ala	Ala	85	90	95	
Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Gln	Trp	Thr	Pro	Trp	Pro	Asp	Ser	His	His	100	105	110	
Gly	Pro	Val	Ile	Thr	Tyr	Leu	Ala	Pro	Cys	Asn	Gly	Asn	Cys	Ser	Thr	115	120	125	
Val	Asp	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Phe	Phe	Lys	Ile	Asp	Gln	Gln	Gly	Leu	130	135	140	
Ile	Asp	Asp	Thr	Ser	Pro	Pro	Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Asp	Asn	Leu	Ile	145	150	155	160
Ala	Asn	Asn	Asn	Ser	Trp	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Asn	Ser	Val	Ala	Pro	165	170	175	
Gly	Asn	Tyr	Val	Leu	Arg	His	Glu	Ile	Ile	Ala	Leu	His	Ser	Ala	Asn	180	185	190	
Asn	Lys	Asp	Gly	Ala	Gln	Asn	Tyr	Pro	Gln	Cys	Ile	Asn	Ile	Glu	Val	195	200	205	
Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ala	Pro	Glu	Gly	Thr	Leu	Gly	Glu	Asp	Leu	210	215	220	
Tyr	His	Asp	Thr	Asp	Pro	Gly	Ile	Leu	Val	Asp	Ile	Tyr	Glu	Pro	Ile	225	230	235	240
Ala	Thr	Tyr	Thr	Ile	Pro	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Thr	Phe	245	250					

<210> 3

<211> 41

<212> ADN

5 <213> *Penicillium* sp.

ES 2 560 805 T3

<400> 3
Acacaactgg ggatccacca tgctgtcttc gacgactcgc a 41

5 <210> 4
<211> 41
<212> ADN
<213> *Penicillium* sp.

10 <400> 4
Gtcaccctct agatctcgac ttcttctaga acgtcggctc a 41

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad celulolítica mejoradora, seleccionado del grupo que consiste en:
5 (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos 80% de identidad al polipéptido maduro de SEC ID nº: 2; y
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 80% de identidad a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1.
- 10 2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2; o un fragmento del mismo con actividad mejoradora celulolítica.
- 15 3. Polipéptido según la reivindicación 1, que es codificado por el polinucleótido contenido en plásmido pGEM-T-GH61 D23Y4 que es contenido en *E. coli* DSM 22882.
- 20 4. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 25 5. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende: (a) cultivar una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- 30 6. Método para producir un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica, que comprende:
 (a) cultivar una célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 4 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- 35 7. Composición de detergente que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 40 8. Método para degradar o convertir un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad mejoradora celulolítica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, que comprende además recuperar el material celulósico degradado.
- 50 10. Método para producir un producto de fermentación, que comprende:
 (a) sacarificar un material celulósico con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad mejoradora celulolítica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
 (b) fermentar el material celulósico sacarificado con uno o varios microorganismos (diferentes) de fermentación para producir el producto de fermentación; y
 (c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.
- 55 11. Método de fermentación de un material celulósico, que comprende: fermentación del material celulósico con uno o varios microorganismos (diferentes) de fermentación, donde el material celulósico se sacarifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad mejoradora celulolítica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 60 12. Método según la reivindicación 11, donde la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación.
- 65 13. Método según la reivindicación 12, que comprende además la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

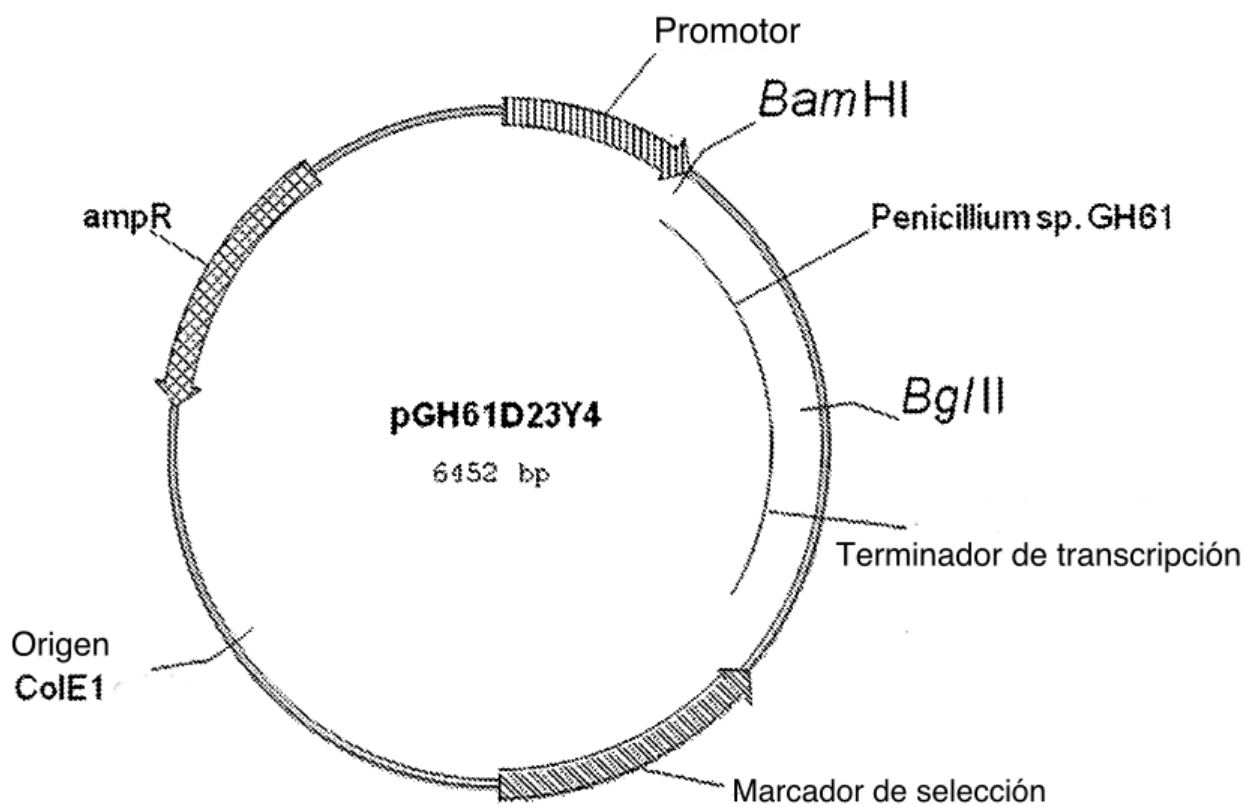


FIG. 1

```

      M L S S T T R T L A F T G L A G L L S A
1  ATGCTGTCTT CGACGACTCG CACCTCTGCC TTTACAGGCC TTGCGGGCCT TCTGTCCGCT
      P L V K A H G F V Q G I V I G D Q F
61  CCCCTGGTCA AGGCCCATGG CTTTGTCCAG GGCATTGTCA TCGGTGACCA ATTGTAAGTC

121  CCTCTCTTGC AGTTCTGTCTG ATTAAGTCTG GACTGCTTG CTTGACTCCC TGCTGACTCC
      Y S G Y I V N S F P Y E S N P P P V .
181  CAACAGCTAC AGCGGGTACA TCGTCAACTC GTTCCCCTAC GAATCCAACC CACCCCCCGT
      . I G W A T T A T D L G F V D G T G Y Q G .
241  CATCGGCTGG GCCACGACCG CCACCGACCT GGGCTTCGTC GACGGCACAG GATACCAAGG
      . P D I I C H R N A T P A P L T A P V A A .
301  CCCGGACATC ATCTGCCACC GGAATGCGAC GCCCGCGCCG CTGACAGCCC CCGTGGCCGC
      . G G T V E L Q W T P W P D S H H G P V I .
361  CGGCGGCACC GTCGAGCTGC AGTGGACGCC GTGGCCGGAC AGCCACCACG GACCCGTCAT
      . T Y L A P C N G N C S T V D K T T L E F .
421  CACCTACCTG GCGCCGTGCA ACGGCAACTG CTCGACCGTC GACAAGACGA CGCTGGAGTT
      . F K I D Q Q G L I D D T S P P G T W A S .
481  CTTCAAGATC GACCAGCAGG GCCTGATCGA CGACACGAGC CCGCCGGGCA CCTGGGCGTC
      . D N L I A N N N S W T V T I P N S V A P .
541  GGACAACCTC ATCGCCAACA ACAATAGCTG GACCGTCACC ATTCCCAACA GCGTCGCCCC
      . G N Y V L R H E I I A L H S A N N K D G .
601  CGGCAACTAC GTCCTGCGCC ACGAGATCAT CGCCCTGCAC TCGGCCAACA ACAAGGACGG
      . A Q N Y P Q C I N I E V T G G G S D A P .
661  CGCCCAGAAC TACCCCCAGT GCATCAACAT CGAGGTCACG GGCGGCGGCT CCGACGCGCC
      . E G T L G E D L Y H D T D P G I L V D I .
721  TGAGGGTACT CTGGGCGAGG ATCTCTACCA TGACACCGAC CCGGGCATTG TGGTGACAT
      . Y E P I A T Y T I P G P P E P T F *
781  TTACGAGCCC ATTGCGACGT ATACCATTCC GGGGCCGCCT GAGCCGACGT TCTAG

```

FIG. 2

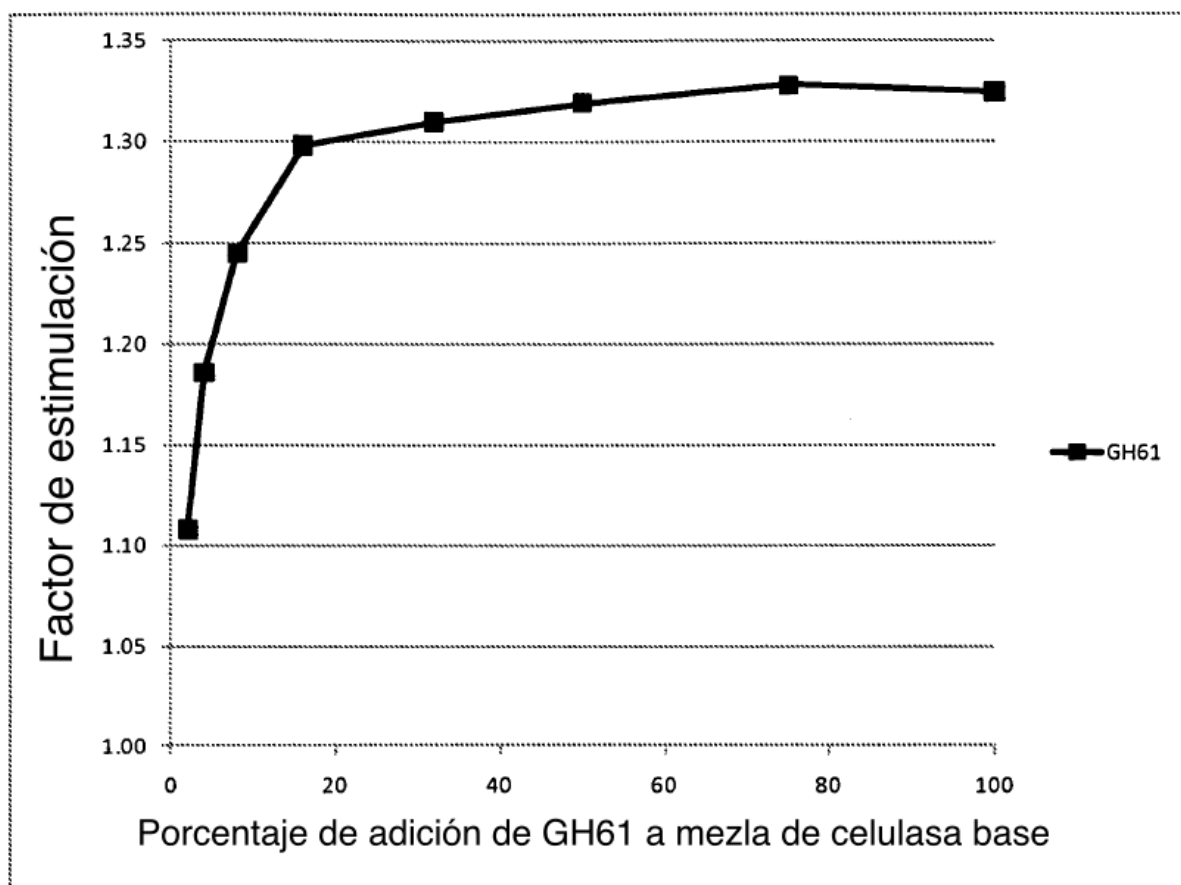


FIG. 3