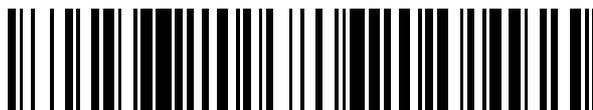


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 382**

51 Int. Cl.:

C12N 1/15	(2006.01)
C12N 1/22	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01)
C12N 9/42	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/12	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C12P 7/10	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2011 E 11838704 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2635690**

54 Título: **Composiciones y métodos para la producción de azúcares fermentables**

30 Prioridad:

02.11.2010 US 409480 P
02.11.2010 US 409472 P
02.11.2010 US 409217 P
02.11.2010 US 409186 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2016

73 Titular/es:

CODEXIS, INC. (100.0%)
200 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

DHAWAN, ISH KUMAR;
BAIDYARROY, DIPNATH;
SHAW, ANDREW;
TANCHAK, OLEH;
HILL, CHRISTOPHER;
LIU, CHENGSONG;
CHOKSHI, AMALA y
SCOTT, BRIAN R.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 570 382 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).

Composiciones y métodos para la producción de azúcares fermentables**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para la producción de azúcares fermentables. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a organismos fúngicos genéticamente modificados. En algunas realizaciones adicionales, la presente invención proporciona enzimas que encuentran uso en potenciar la hidrólisis de material celulósico a azúcares fermentables (por ejemplo, glucosa), y métodos de uso de las enzimas. En algunas realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a mezclas enzimáticas útiles para la hidrólisis de materiales celulósicos.

15 ANTECEDENTES

La celulosa es un polímero de la azúcar simple glucosa ligada por enlaces glucosídicos beta-1,4. Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos ligados en beta. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas. Las endoglucanasas digieren el polímero de celulosa en localizaciones aleatorias, abriéndolo al ataque por celobiohidrolasas. Las celobiohidrolasas liberan secuencialmente moléculas de celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero ligado en beta-1,4 soluble en agua de glucosa. Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa a glucosa.

La conversión de materia primas lignocelulósicas en etanol tiene las ventajas de la rápida disponibilidad de grandes cantidades de materia prima, la conveniencia de evitar la quema o enterrar los materiales, y menor producción de gas de invernadero global. La madera, residuos agrícolas, cosechas herbáceas y residuos sólidos municipales se han considerado materias primas para la producción de etanol. Estos materiales consisten principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina. Una vez la celulosa se convierte en glucosa, la glucosa es fácilmente fermentada por la levadura en etanol.

30 Aunque se ha hecho progreso en aumentar la eficiencia de degradación enzimática de materias primas lignocelulósicas, queda una gran necesidad por mejorar el rendimiento de azúcares fermentables usando procesos enzimáticos.

El documento WO 2009/033071 desvela enzimas fúngicas para la conversión de biomasa en azúcares, que incluye el uso de *Myceliophthora thermophila cdh1* como enzima secundaria. El documento WO 2011/066457 desvela mezclas enzimáticas aisladas de *Myceliophthora thermophila*. El documento WO 2010/080407 estudió el efecto de la adición de *Myceliophthora thermophila* CDH1 exógena a una mezcla enzimática obtenida de *Trichoderma reesei* sobre la hidrólisis de forraje de maíz pretratado, y el documento WO 2010/080532 estudió el mismo efecto sobre la hidrólisis de celulosa microcristalina y forraje de maíz pretratado. El documento EP1482033 estudió los efectos de tratamiento con células de *Coriolus hirsutus* que tenían actividad de celobiosa deshidrogenasa suprimida sobre pulpa mecánica. Subramaniam et al. (Archives of Biochemistry and Biophysics, (1999) 365(2): 223-230) desvelan la clonación y caracterización de celobiosa deshidrogenasa de *Sporotrichum thermophile* (también conocido como *Myceliophthora thermophila*). Henriksson et al. (J. Biotech. (2000) 78(2): 93-113) proporciona una revisión de celobiosa deshidrogenasas.

45 SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona una célula fúngica de *Myceliophthora thermophila* que se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de celobiosa endógena de dos o más enzimas oxidantes de celobiosa endógena que se producen por la célula fúngica, en la que la célula fúngica se ha modificado genéticamente para delecionar al menos parcialmente los genes que codifican las dos o más enzimas oxidantes de celobiosa endógena, en la que la primera de las dos o más enzimas oxidantes de celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 6, y en la que la segunda de las dos o más enzimas oxidantes de celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 8.

La invención también proporciona un método de generación de celobiosa y/o glucosa que comprende poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en el que la mezcla enzimática se produce por la célula fúngica de la invención, y en el que la mezcla enzimática comprende una glucósido hidrolasa 61 (GH61), una celobiohidrolasa tipo 2b (CBH2b), una celobiohidrolasa tipo 1 (CBH1), una beta-glucosidasa (Bgl), y al menos una endoglucanasa (EG).

La invención proporciona además un medio de fermentación que comprende la célula fúngica de la invención.

65

SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación proporciona organismos fúngicos genéticamente modificados, además de enzimas que potencian la hidrólisis de material celulósico a glucosa, y métodos de uso de las enzimas.

5 La presente divulgación proporciona células fúngicas que han sido genéticamente modificadas para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que se produce por las células fúngicas. En algunas realizaciones, la célula fúngica es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y/o en la que la célula fúngica es de la familia Chaetomiaceae. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Harmicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Ctenomyces*, *Chrysosporium*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus* o *Aspergillus*. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Chrysosporium*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*, mientras que en algunas otras realizaciones, la célula fúngica es *Sporotrichum thermophile*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia heterothallica*, *Thielavia terrestris*, *Corynascus heterothallicus* o *Myceliophthora thermophila*. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de glucosa oxidasa y/o celobiosa deshidrogenasa endógena que se produce por la célula fúngica. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de glucosa oxidasa y/o celobiosa deshidrogenasa endógena que se produce por la célula fúngica y para aumentar la producción de al menos una enzima hidrolizante de sacárido. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de glucosa oxidasa y/o celobiosa deshidrogenasa endógena que se produce por la célula fúngica y para aumentar la producción de al menos una enzima hidrolizante de sacárido, y en la que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniophora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de la glucosa oxidasa y/o celobiosa deshidrogenasa endógena que es secretada por la célula fúngica. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para alterar el péptido señal de secreción de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que se expresa por la célula fúngica. En todavía algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para alterar una secuencia de iniciación de la traducción en el transcrito que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para introducir una mutación del marco de lectura en el transcrito que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir el nivel de transcripción de un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para alterar un promotor de un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En todavía algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para delecionar al menos parcialmente al menos un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la eficiencia catalítica de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para mutar uno o más residuos en un sitio activo de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para mutar uno o más residuos en un dominio de unión a hemo de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones de las células fúngicas proporcionadas en el presente documento, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa está seleccionada de celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18), glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), piranosa oxidasa (EC1.1.3.10), gluco-oligosacárido oxidasa (EC 1.1.99.B3), piranosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.29) y glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.10). En algunas realizaciones adicionales, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % idéntica a SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16. En algunas realizaciones adicionales, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18). En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena que se producen por la célula fúngica antes de la modificación genética. En algunas realizaciones adicionales, la primera de las dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %,

aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % idéntica a SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16, y una segunda de las dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % idéntica a SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16.

La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por al menos una de las células fúngicas proporcionadas en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se produce por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula fúngica, y en las que la célula fúngica es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*.

La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se produce por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula fúngica y para aumentar la producción de al menos una enzima hidrolizante de sacárido, en las que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes.

En algunas realizaciones de la divulgación, las mezclas enzimáticas son mezclas libres de células. En algunas realizaciones adicionales, un sustrato de la mezcla enzimática comprende lignocelulosa pretratada. En algunas realizaciones adicionales, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por un método de tratamiento seleccionado de pretratamiento con ácido, pretratamiento con amonio, explosión por vapor y/o extracción con disolvente orgánico.

La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que la mezcla de enzima celulasa fúngica se modifica con respecto a una mezcla enzimática parental (o de referencia) para ser al menos parcialmente deficiente en actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa.

La presente divulgación proporciona además mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, siendo al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa endógena a una célula fúngica, en las que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina y en las que la mezcla enzimática se caracteriza porque, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 20 %, de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas.

En algunas realizaciones de las mezclas enzimáticas de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática de glucosa y/o celobiosa oxidasa que es secretada por la célula fúngica. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática comprende al menos una beta-glucosidasa. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática comprende al menos una enzima celulasa seleccionada de endoglucanasas (EG), beta-glucosidasas (BGL), celobiohidrolasas tipo 1 (CBH1), celobiohidrolasas tipo 2 (CBH2) y/o glucósido hidrolasas 61 (GH61), y/o variantes de la enzima celulasa. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende además al menos una celobiosa deshidrogenasa. En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa es CDH1 y/o CDH2. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática comprende además al menos una enzima celulasa y/o al menos una enzima adicional. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática ha sido sometida a un proceso de purificación para eliminar selectivamente una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones, el proceso de purificación comprende precipitación selectiva para separar las enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de otras enzimas presentes en la mezcla enzimática. En algunas realizaciones adicionales, las mezclas enzimáticas comprenden al menos un inhibidor de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes

de celulosa es endógena a una célula fúngica que es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y en los que la mezcla enzimática se caracteriza porque, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, o aproximadamente el 20 % de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Harmicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a una célula fúngica que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes, y en los que la mezcla enzimática se caracteriza porque, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 20 % de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athalia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniphora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a una célula fúngica que es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y en los que, de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, o aproximadamente el 90 %, está presente en forma de celobiosa y/o glucosa. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Harmicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*. En algunas realizaciones, el ascomiceto es *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia heterothallica* o *Sporotrichum thermophile*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es *Myceliophthora thermophila*.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a una célula fúngica que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes, y en los que, de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, o aproximadamente el 90 %, está presente en forma de celobiosa y/o glucosa. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniphora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*.

La presente divulgación también proporciona métodos de producción de celobiosa y/o glucosa a partir de celulosa que comprenden tratar un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática para generar glucosa, en los que la mezcla enzimática se modifica con respecto a una mezcla enzimática secretada de una célula fúngica de referencia (o parental) para ser al menos parcialmente deficiente en actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones de los métodos, la mezcla enzimática es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones adicionales, el sustrato de celulosa comprende lignocelulosa pretratada. En algunas realizaciones adicionales, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por un método de tratamiento seleccionado de pretratamiento con ácido, pretratamiento con amonio, explosión por vapor y/o extracción con disolvente orgánico. En algunas realizaciones adicionales, los métodos comprenden además fermentación de la celobiosa y/o glucosa a un producto final. En algunas realizaciones, el producto final es al menos un alcohol combustible y/o al menos un producto químico industrial de precursor. En algunas realizaciones adicionales, el alcohol combustible es etanol o butanol. En algunas realizaciones, el proceso para producir celobiosa y/o glucosa a partir de celulosa y dicha fermentación se realizan en un proceso de sacarificación y fermentación (SSF) simultáneo. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática se produce por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula fúngica. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática ha sido sometida a un proceso de purificación para eliminar selectivamente al menos una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones adicionales, el proceso de purificación comprende precipitación selectiva para separar la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa de otras enzimas presentes en la mezcla enzimática. En todavía algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática comprende al menos un inhibidor de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, el inhibidor comprende un inhibidor de oxidasa de amplio espectro seleccionado de azida de sodio, cianuro de potasio, un anión metálico, y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor comprende un inhibidor específico de celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18) seleccionado de celobioimidazol, gentiobiosa, lactobiono-1,5-lactona, celiobono-1,5-lactona, tri-N-acetilquitotriosa, metil-beta-D-celobiosidasa, 2,2-bipiridina, citocromo C, y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones,

el método es un proceso discontinuo, mientras que en algunas otras realizaciones es un proceso continuo, y en algunas realizaciones adicionales es un proceso de lotes alimentados y en todavía más realizaciones es una combinación de procesos discontinuos, continuos y/o de lotes alimentados realizados en cualquier orden. En algunas realizaciones, el método se realiza en un volumen de reacción de al menos 10.000 litros, mientras que en algunas otras realizaciones el método se realiza en un volumen de reacción de al menos 100.000 litros. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende al menos una beta-glucosidasa, mientras que en algunas otras realizaciones la mezcla enzimática no comprende una beta-glucosidasa. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende al menos una endoglucanasa, mientras que en algunas otras realizaciones la mezcla enzimática no comprende una endoglucanasa. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende al menos una enzima celulasa seleccionada de endoglucanasas (EG), beta-glucosidasas (BGL), celobiohidrolasas tipo 1 (CBH1), celobiohidrolasas tipo 2 (CBH2) y/o glucósido hidrolasas 61 (GH61), y/o variantes de dicha enzima celulasa.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de glucosa que comprenden poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en los que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se produce por las células fúngicas proporcionadas en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de glucosa que comprenden poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en los que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se produce por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula fúngica, en los que la célula fúngica es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de glucosa que comprenden poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en los que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se produce por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula fúngica y para aumentar la producción de al menos una enzima hidrolizante de sacárido, en los que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes.

La presente divulgación proporciona además métodos de generación de glucosa que comprenden poner en contacto celulosa con al menos una mezcla enzimática como se proporciona en el presente documento. En algunas realizaciones, la celulosa comprende lignocelulosa pretratada. En algunas realizaciones adicionales, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por un método de tratamiento seleccionado de pretratamiento con ácido, pretratamiento con amonio, explosión por vapor y/o extracción con disolvente orgánico. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones adicionales, los métodos comprenden además fermentación de la glucosa a un producto final. En algunas realizaciones, el producto final es un alcohol combustible o un producto químico industrial de precursor. En algunas realizaciones, el alcohol combustible es etanol o butanol.

La presente divulgación proporciona además las células fúngicas proporcionadas en el presente documento, además de las mezclas enzimáticas proporcionadas en el presente documento, y los métodos proporcionados en el presente documento, que comprenden además una enzima que degrada celulosa que es heteróloga a la célula fúngica.

La presente divulgación también proporciona medios de fermentación que comprenden al menos una célula fúngica proporcionada en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona medios de fermentación que comprenden al menos una mezcla enzimática proporcionada en el presente documento.

La presente divulgación proporciona además medios de fermentación que comprenden al menos una célula fúngica y/o al menos una mezcla enzimática, como se proporciona en el presente documento.

La presente divulgación también proporciona métodos de producción de al menos una celulasa, que comprenden al menos una célula fúngica proporcionada en el presente documento, en condiciones tales que se produzca dicha al menos una celulasa. En algunas realizaciones, la célula fúngica es recombinante.

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden al menos una celulasa como se proporciona en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los productos de la hidrólisis de celulosa usando mezclas enzimáticas obtenidas de las cepas CF-402, CF-403 y CF-401 como se describe adicionalmente en el Ejemplo 1 y Ejemplo 7. Las barras oscuras representan la producción de glucosa medida. Las barras claras representan producción de gluconato medida. Los números encima de las barras horizontales indican la suma de las fracciones de glucosa y gluconato.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los productos de la hidrólisis de celulosa usando mezclas enzimáticas producidas por la cepa CF-400 (que comprende una deleción de *cdh1*); cepa CF-401 (que comprende las deleciones de *cdh1* y *cdh2*) y la cepa CF-402 (que comprende *cdh1* y *cdh2*), como se describe adicionalmente en el Ejemplo 8.

Las Figs. 3 y 4 proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de CDH1 y CDH2 de *M. thermophila* (SEQ ID NOS: 5-8).

Las Figs. 5 y 6 proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de GO1 y GO2 de *M. thermophila* (SEQ ID NOS: 1-4).

La Fig. 7 proporciona las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de piranosa oxidasa de *A. oryzae* (SEQ ID NOS: 9-10).

La Fig. 8 proporciona las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de gluco-oligosacárido oxidasa de *A. strictum* (SEQ ID NOS: 11-12).

La Fig. 9 proporciona las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de piranosa deshidrogenasa de *A. bisporus* (SEQ ID NOS: 13-14).

La Fig. 10 proporciona las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de glucosa deshidrogenasa de *T. stipitatus* ATCC10500 (SEQ ID NOS: 15-16).

La Fig. 11 proporciona un gráfico que muestra la recuperación fraccionaria de celulosa disponible usando una mezcla enzimática que contiene actividad de celobiosa deshidrogenasa. Las barras oscuras representan el rendimiento de glucosa como se mide usando un ensayo enzimático acoplado a peroxidasa de rábano picante descrito en el Ejemplo 1. Las barras claras representan el rendimiento de glucosa esperado calculado usando el método de IR para determinar la conversión de celulosa descrita en el Ejemplo 9.

La Fig. 12A y 12B son cromatogramas de HPLC que muestran el efecto de la hidrólisis ácida de celotriosa (Fig. 12A) o de la hidrólisis de productos de celulosa producidos por una mezcla enzimática que contiene celobiosa deshidrogenasa (Fig. 12B) como se describe en el Ejemplo 11.

La Fig. 13 proporciona un espectro de IR de hidrolizado de celulosa obtenido usando mezclas enzimáticas que carecen (Turbo) o que contienen (CF-402) actividad de celobiosa deshidrogenasa. La flecha vertical indica el pico de carbonilo a 1715 cm^{-1} único para el hidrolizado producido por la mezcla enzimática de CF-402.

Las Figs. 14A y 14B son cromatogramas de HPLC que identifican un producto de glucosa oxidado producido a partir de glucosa (Fig. 5A) o de hidrolizado de celulosa usando enzimas celulasas secretadas por la cepa CF-402, como se describe en el Ejemplo 13.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona organismos fúngicos genéticamente modificados, además de enzimas que potencian la hidrólisis de material celulósico a glucosa, y métodos de uso de las enzimas.

A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención implica técnicas convencionales comúnmente usadas en biología molecular, fermentación, microbiología y campos relacionados, que son conocidos para aquellos expertos en la materia. A menos que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento pueda usarse en la práctica o prueba de la presente invención, se describen algunos métodos adecuados y materiales. De hecho, se pretende que la presente invención no se limite a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos en el presente documento, ya que éstos pueden variar, dependiendo del contexto en que se usan. Los encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente invención.

Sin embargo, con el fin de facilitar el entendimiento de la presente invención, a continuación se definen varios términos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Así, cada intervalo numérico en el presente documento pretende englobar cada intervalo numérico más estrecho que entra dentro de tal intervalo numérico más ancho, como si tales intervalos numéricos más estrechos estuvieran todos explícitamente escritos en el presente documento. También está previsto que cada limitación numérica máxima (o mínima) desvelada en el presente documento incluya cada limitación numérica inferior (o superior), como si tales limitaciones numéricas inferiores (o superiores) se escribieran explícitamente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “que comprende” y sus relacionados se usan en su sentido

incluyente (es decir, equivalente al término “que incluye” y sus relacionados correspondientes).

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, el singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen la referencia plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a una “célula huésped” incluye una pluralidad de tales células huésped.

A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente. Los encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que pueden ser tenidos por referencia a la memoria descriptiva en conjunto. Por consiguiente, los términos definidos a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en conjunto.

Como se usa en el presente documento, “sustrato” se refiere a una sustancia o compuesto que se convierte o pretende convertirse en otro compuesto por la acción de una enzima. El término incluye no solo un único compuesto, sino también combinaciones de compuestos, tales como disoluciones, mezclas y otros materiales que contienen al menos un sustrato.

Como se usa en el presente documento, “conversión” se refiere a la transformación enzimática de un sustrato al producto correspondiente. “Porcentaje de conversión” se refiere al porcentaje del sustrato que se convierte en el producto dentro de un periodo de tiempo bajo condiciones especificadas. Así, por ejemplo, la “actividad enzimática” o “actividad” de un polipéptido de celobiosa deshidrogenasa (“CDH” o “cdh”) puede expresarse como el “porcentaje de conversión” del sustrato al producto.

Como se usa en el presente documento, “actividad secretada” se refiere a la actividad enzimática de enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa producidas por una célula fúngica que está presente en un entorno extracelular. Un entorno extracelular puede ser, por ejemplo, un medio extracelular tal como un medio de cultivo. La actividad secretada está influida por la cantidad total de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada, y también está influida por la eficiencia catalítica de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada.

Como se usa en el presente documento, una “reducción en la eficiencia catalítica” se refiere a una reducción en la actividad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, con respecto a la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa sin modificar, como se mide usando técnicas convencionales, como se proporciona en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término “mezcla enzimática” se refiere a una combinación de al menos dos enzimas. En algunas realizaciones, al menos dos enzimas están presentes en una composición. En algunas realizaciones adicionales, las mezclas enzimáticas están presentes dentro de una célula (por ejemplo, una célula fúngica). En algunas realizaciones, cada una o algunas de las enzimas presentes en una mezcla enzimática se producen por diferentes células fúngicas y/o diferentes cultivos fúngicos. En algunas realizaciones adicionales, todas las enzimas presentes en una mezcla enzimática se producen por la misma célula. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas comprenden enzimas celulasas, mientras que en algunas realizaciones adicionales las mezclas enzimáticas comprenden enzimas distintas de celulasas. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas comprenden al menos una celulasa y al menos una enzima distinta de una celulasa. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas comprenden enzimas que incluyen, pero no se limitan a, endoxilanasas (EC 3.2.1.8), beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37), alfa-L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), alfa-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetil xilano esterasas (EC 3.1.1.72), feruloil esterasas (EC 3.1.1.73), cumaroil esterasas (EC 3.1.1.73), alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22), beta-galactosidasas (EC 3.2.1.23), beta-mananasas (EC 3.2.1.78), beta-manosidasas (EC 3.2.1.25), endo-poligalacturonasas (EC 3.2.1.15), pectin metil esterasas (EC 3.1.1.11), endo-galactanasas (EC 3.2.1.89), pectin acetil esterasas (EC 3.1.1.6), endo-pectin liasas (EC 4.2.2.10), pectato liasas (EC 4.2.2.2), alfa ramnosidasas (EC 3.2.1.40), exo-galacturonasas (EC 3.2.1.82), exo-galacturonasas (EC 3.2.1.67), exopoligalacturonato liasas (EC 4.2.2.9), ramnogalacturonano endoliasas EC (4.2.2.B3), ramnogalacturonano acetilesterasas (EC 3.2.1.B11), ramnogalacturonano galacturonohidrolasas (EC 3.2.1.B11), endo-arabinanasas (EC 3.2.1.99), lacasas (EC 1.10.3.2), peroxidadas dependientes de manganeso (EC 1.10.3.2), amilasas (EC 3.2.1.1), glucoamilasas (EC 3.2.1.3), lipasas, lignina peroxidadas (EC 1.11.1.14) y/o proteasas.

En algunas realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona además mezclas enzimáticas que comprenden al menos una expansina y/o proteína similar a expansina, tal como una swolenina (véase, por ejemplo, Salheimo et al., Eur. J. Biochem., 269:4202-4211 [2002]) y/o una proteína similar a swolenina. Las expansinas participan en el aflojamiento de la estructura de la pared celular durante el crecimiento de las células de planta. Se ha propuesto que las expansinas alteran el enlace de hidrógeno entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De esta forma, se cree que permiten el deslizamiento de las fibras de celulosa y el agrandamiento de la pared celular. La swolenina, una proteína similar a expansina, contiene un dominio de la familia 1 del módulo de unión a hidrato de carbono del extremo N (CBD) y un dominio similar a expansina del extremo C. En algunas realizaciones, una proteína similar a expansina y/o proteína similar a swolenina comprende uno o ambos de tales dominios y/o altera la estructura de paredes celulares (por ejemplo, alterando la estructura de

celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores. En algunas realizaciones adicionales, las mezclas enzimáticas comprenden al menos un producto de polipéptido de una proteína integrante de celulosa, scaffoldina y/o una proteína similar a scaffoldina (por ejemplo, CipA o CipC de *Clostridium thermocellum* o *Clostridium cellulolyticum*, respectivamente). En algunas realizaciones adicionales, las mezclas enzimáticas comprenden al menos una proteína inducida por celulosa y/o proteína moduladora (por ejemplo, como se codifica por el gen cip1 o cip2 y/o genes similares de *Trichoderma reesei*; véase, por ejemplo, Foreman et al., J. Biol. Chem., 278:31988-31997 [2003]). En algunas realizaciones adicionales, las mezclas enzimáticas comprenden al menos un miembro de cada una de las clases de los polipéptidos descritos anteriormente, varios miembros de una clase de polipéptidos, o cualquier combinación de estas clases de polipéptido para proporcionar mezclas enzimáticas adecuadas para diversos usos.

Cualquier combinación de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más de cinco enzimas y/o polipéptidos, encuentran uso en diversas mezclas enzimáticas proporcionadas en el presente documento. De hecho, no se pretende que las mezclas enzimáticas de la presente invención se limiten a cualquier enzima particular, polipéptido, ni combinaciones, ya que cualquier mezcla enzimática adecuada encuentra uso en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "sacárido" se refiere a cualquier hidrato de carbono que comprenda monosacáridos (por ejemplo, glucosa, ribosa, fructosa, galactosa, etc.), disacáridos (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, melibiosa, etc.), oligosacáridos (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa, amilosa, etc.), y polisacáridos (por ejemplo, almidón, glucógeno, celulosa, quitina, xilano, arabinoxilano, manano, fucoidano, galactomanano, calosa, laminarina, crisolaminarina, amilopectina, dextrano, dextrinas, maltodextrinas, inulina, oligofructosa, polidextrosa, etc.). El término engloba hidratos de carbono simples, además de hidratos de carbono complejos. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún sacárido particular, ya que diversos sacáridos y formas de sacáridos encuentran uso en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "enzima hidrolizante de sacárido" se refiere a cualquier enzima que hidrolice al menos un sacárido.

Como se usa en el presente documento, los términos "enzima oxidante de glucosa" y "enzima oxidante de celobiosa" se refieren a enzimas que oxidan glucosa y/o celobiosa. Por ejemplo, las enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa incluyen glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18), piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10), gluco-oligosacárido oxidasa (EC 1.1.99.B3), piranosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.29) y glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.10).

Como se usa en el presente documento, los términos "glucosa oxidasa" y "GO" se refieren a una enzima que es una oxidoreductasa que cataliza la oxidación de β -D-glucosa en D-glucono-1,5-lactona, que es un éster cíclico que existe a un equilibrio dependiente del pH en disolución acuosa con ácido glucónico o gluconato. Glucosa oxidasas a modo de ejemplo se clasifican en la clasificación de enzimas (EC 1.1.3.4). Con el fin de trabajar como catalizador, las glucosa oxidasas normalmente utilizan un oxidante de co-sustrato, tal como dinucleótido de flavina-adenina (FAD). La enzima es altamente específica para β -D-glucosa. Sin embargo, la glucosa oxidasa también puede demostrar actividad de oxidasa algo menor para los sustratos 2-desoxi-D-glucosa, D-manosa y D-galactosa (véase, por ejemplo, Bentley, Meth. Enzymol., 9:86 [1996]).

Como se usa en el presente documento, los términos "celobiosa deshidrogenasa" y "CDH" se refieren a una celobiosa:aceptor 1-oxidoreductasa que cataliza la conversión de celobiosa en presencia de un aceptor a celobiono-1,5-lactona y un aceptor reducido. Ejemplos de celobiosa deshidrogenasas se clasifican en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.99.18). Normalmente, el 2,6-dicloroindofenol puede actuar de aceptor, como puede ser hierro, especialmente $\text{Fe}(\text{SCN})_3$, oxígeno molecular, ubiquinona o citocromo C, y otros polifenólicos, tales como lignina. Los sustratos de la enzima incluyen celobiosa, celo-oligosacáridos, lactosa y D-glucosil-1,4- β -D-manosa, glucosa, maltosa, manobiosa, tiocelobiosa, galactosil-manosa, xilobiosa, xilosa. Los donantes de electrones incluyen beta-1-4 dihexosas con glucosa o manosa en el extremo reductor, aunque alfa-1-4 hexósidos, hexosas, pentosas y beta-1-4 pentómeros pueden actuar de sustratos para al menos algunas de estas enzimas (véanse, por ejemplo, Henriksson et al., Biochim. Biophys. Acta-Prot. Struct. Mol. Enzymol., 1383: 48-54 [1998]; y Schou et al., Biochem. J., 330: 565-571 [1998]).

Como se usa en el presente documento, los términos "oxidación", "oxidar (oxidado)" y similares como se usan en el presente documento se refieren a la formación enzimática de uno o más productos de oxidación de glucosa o celobiosa que incluyen, pero no se limitan a, celobionolactona, ácido celobiónico, gluconolactona, gluconato y/o ácido glucónico. Cuando se usa en referencia a un porcentaje de celobiosa y/o glucosa oxidada, aquellos porcentajes reflejan un porcentaje en peso (peso/peso) con respecto a la cantidad inicial de sustrato. Por ejemplo, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o glucosa, el porcentaje de celobiosa y/o glucosa oxidada refleja un porcentaje en peso (peso/peso) con respecto a la cantidad inicial de celobiosa y/o glucosa presente en disolución. Si la mezcla enzimática se pone en contacto con un sustrato de celulosa, el porcentaje de celobiosa y/o glucosa oxidada refleja un porcentaje en peso (peso/peso) basado en la cantidad máxima (% en peso) de glucosa que podría producirse a partir de la celulosa hidrolizada total (es decir, Gmáx).

Como se usa en el presente documento, los términos “celobiosa deshidrogenasa” y “CDH” se refieren a una celobiosa:aceptor 1-oxidorreductasa que cataliza la conversión de celobiosa en presencia de un aceptor a celobiono-1,5-lactona y un aceptor reducido. Ejemplos de celobiosa deshidrogenasas están incluidos en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.99.18). En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa de interés en la presente invención es CDH1, que está codificada por el gen *cdh1*. En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa de interés en la presente invención es CDH2, que está codificada por el gen *cdh2*. En algunas realizaciones, tanto CDH1 como CDH2 son de interés.

Como se usa en el presente documento, los términos “piranosa oxidasa” y “PO” se refieren a una enzima que cataliza la conversión de D-glucosa y O₂ a 2-dehidro-D-glucosa y H₂O₂. Ejemplos de piranosa oxidasas se clasifican en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.3.10). El nombre sistemático de esta clase de enzimas es piranosa:oxígeno 2-oxidorreductasa. Otros nombres en uso común incluyen glucosa 2-oxidasa y piranosa-2-oxidasa. Los sustratos de la enzima incluyen D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, L-sorbosa, D-glucono-1,5-lactona, celobiosa y gentiobiosa.

Como se usa en el presente documento, los términos “gluco-oligosacárido oxidasa” y “GOOX” se refieren a una enzima que cataliza la oxidación de oligosacáridos con glucosa sobre el extremo reductor y cada residuo de azúcar unido por un enlace glucosídico alfa- o beta-1,4. Ejemplos de gluco-oligosacárido oxidasa se clasifican en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.99.B3). El nombre sistemático de esta clase de enzimas es hidrato de carbono:aceptor oxidorreductasa. Los sustratos de la enzima incluyen maltosa, lactosa, celobiosa y derivados de maltosa de hasta siete residuos.

Como se usa en el presente documento, los términos “piranosa deshidrogenasa” y “PDH” se refieren a una enzima que cataliza la reacción de piranosa y un aceptor para dar 2-deshidropiranosa (o 3-deshidropiranosa o 2,3-dideshidropiranosa) y un aceptor reducido. PDH también cataliza la reacción de un piranósido y un aceptor para dar un 3-deshidropiranósido (o 3,4-dideshidropiranósido) y un aceptor reducido. Ejemplos de piranosa deshidrogenasas se clasifican en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.99.29). El nombre sistemático de esta clase de enzimas es piranosa:aceptor oxidorreductasa. Otros nombres en uso común incluyen piranosa 2,3-deshidrogenasa. PDH utiliza FAD como cofactor. Varias aldosas y cetosas en forma de piranosa, además de glucósidos, gluco-oligosacáridos, sacarosa y lactosa pueden actuar de donante. 1,4-Benzoquinona o ión ferricenio (ferroceno oxidado por eliminación de un electrón) pueden servir de aceptor. A diferencia de EC 1.1.3.10 (piranosa oxidasa), la piranosa deshidrogenasa no interacciona con O₂ y presenta tolerancia del sustrato extremadamente ancha con regioselectividad variable (C-3, C-2 o C-3 + C-2 o C-3 + C-4) para la (di)oxidación de diferentes azúcares. La D-glucosa se oxida exclusivamente o preferencialmente en C-3 (dependiendo de la fuente de enzima), pero también puede oxidarse en C-2 + C-3. La piranosa deshidrogenasa también actúa sobre 1->4-alfa- y 1->4-beta-gluco-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos no reductores y L-arabinosa, que no son sustratos de EC 1.1.3.10. Los azúcares se oxidan por piranosa deshidrogenasa en su piranosa, pero no en su forma de furanosa.

Como se usa en el presente documento, los términos “glucosa deshidrogenasa” y “GDH” se refieren a una enzima que cataliza la reacción de D-glucosa y un aceptor para dar D-glucono-1,5-lactona y un aceptor reducido. Ejemplos de glucosa deshidrogenasa se clasifican en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.99.10). El nombre sistemático de esta clase de enzimas es D-glucosa:aceptor 1-oxidorreductasa. GDH utiliza FAD como cofactor.

Como se usa en el presente documento, el término “celulasa” se refiere a cualquier enzima que sea capaz de degradar la celulosa. Así, el término engloba enzimas capaces de hidrolizar celulosa (β -1,4-glucano o enlaces β -D-glucosídicos) para acortar las cadenas de celulosa, oligosacáridos, celobiosa y/o glucosa. Las “celulasas” se dividen en tres sub-categorías de enzimas: 1,4- β -D-glucano glucanohidrolasa (“endoglucanasa” o “EG”); 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa (“exoglucanasa”, “celobiohidrolasa” o “CBH”); y β -D-glucósido-glucohidrolasa (“ β -glucosidasa”, “celobiasa”, “BG” o “BGL”). Estas enzimas actúan de común acuerdo para catalizar la hidrólisis de sustratos que contienen celulosa. Las endoglucanasas rompen los enlaces internos y alteran la estructura cristalina de la celulosa, exponiendo cadenas de polisacárido de celulosa individuales (“glucanos”). Las celobiohidrolasas acortan gradualmente las moléculas de glucano, liberando principalmente unidades de celobiosa (un dímero ligado a β -1,4 soluble en agua de glucosa), además de glucosa, celotriosa y celotetrosa. Las beta-glucosidasas fraccionan la celobiosa en monómeros de glucosa.

Las celulasas comprenden frecuentemente una mezcla de diferentes tipos de enzimas celulolíticas (endoglucanasas y celobiohidrolasas) que actúan sinérgicamente para degradar la celulosa a di- u oligosacáridos solubles tales como celobiosa, que entonces se hidrolizan adicionalmente a glucosa por beta-glucosidasas. Las enzimas celulasa se producen por una amplia variedad de microorganismos. Las celulasas (y hemicelulasas) de hongos filamentosos y algunas bacterias se explotan ampliamente para muchas aplicaciones industriales que implican el procesamiento de fibras naturales a azúcares.

Como se usa en el presente documento, una “célula fúngica productora de celulasa” es una célula fúngica que produce al menos una enzima celulasa (es decir, “enzima hidrolizante de celulosa”). En algunas realizaciones, las células fúngicas productoras de celulasa proporcionadas en el presente documento expresan y secretan una mezcla de enzimas hidrolizantes de celulosa. Como se usa en el presente documento, los términos “enzima hidrolizante de celulosa”, “enzima celulolítica” y términos similares se refieren a una enzima que actúa en el proceso de degradación

de la celulosa a di- u oligosacáridos solubles tales como celobiosa, que entonces se hidrolizan adicionalmente a glucosa por beta-glucosidasa. Una mezcla de enzimas hidrolizantes de celulosa también se denomina en el presente documento "celulasas", una "mezcla que contiene celulasa" y/o una "mezcla de celulasas".

5 Como se usa en el presente documento, los términos "endoglucanasa" y "EG" se refieren a una categoría de celulasas (EC 3.2.1.4) que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos β -1,4 internos de celulosa. El término "endoglucanasa" se define adicionalmente en el presente documento como una endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.4), que cataliza la endo-hidrólisis de enlaces glucosídicos 1,4-beta-D en celulosa, derivados de celulosa (tales como carboximetilcelulosa y hidroxietilcelulosa), liquenano, enlaces beta-1,4 en beta-1,3-glucanos mixtos tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material de planta que contenga componentes celulósicos. La actividad de endoglucanasa puede determinarse basándose en una reducción en la viscosidad del sustrato o aumento en extremos reductores determinado por un ensayo de azúcar reductor (véase, por ejemplo, Zhang et al., *Biotechnol. Adv.*, 24:452-481 [2006]). Para fines de la presente invención, la actividad de endoglucanasa se determina usando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) (véase, por ejemplo, Ghose, *Pur. Appl. Chem.*, 59:257-268 [1987]).

20 Como se usa en el presente documento, "EG1" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio catalítico de la familia 7 de glucosidasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo de los mismos. En algunas realizaciones, la EG1 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

25 Como se usa en el presente documento, el término "EG2" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio catalítico de la familia 5 de glucosidasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo de los mismos. En algunas realizaciones, la EG2 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

30 Como se usa en el presente documento, el término "EG3" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio catalítico de la familia 12 de glucosidasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo de los mismos. En algunas realizaciones, la EG3 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

35 Como se usa en el presente documento, el término "EG4" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio catalítico de la familia 61 de glucosidasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento de los mismos. En algunas realizaciones, la EG4 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

40 Como se usa en el presente documento, el término "EG5" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio catalítico de la familia 45 de glucosidasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento de los mismos. En algunas realizaciones, la EG5 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

50 Como se usa en el presente documento, el término "EG6" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio catalítico de la familia 6 de glucosidasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento de los mismos. En algunas realizaciones, la EG6 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

55 Como se usa en el presente documento, los términos "celobiohidrolasa" y "CBH" se refieren a una categoría de celulasas (EC 3.2.1.91) que hidrolizan enlaces glucosídicos en celulosa. El término "celobiohidrolasa" se define adicionalmente en el presente documento como una 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos 1,4-beta-D en celulosa, celooligosacáridos, o cualquier glucosa ligada a beta-1,4 que contiene polímero, liberando celobiosa de los extremos reductores o no reductores de la cadena (véanse, por ejemplo, Teeri, *Tr. Biotechnol.*, 15:160-167 [1997]; y Teeri et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 26:173-178 [1998]). En algunas realizaciones, la actividad de celobiohidrolasa se determina usando un derivado de disacárido fluorescente 4-metilumbelliferil-.beta.-D-lactósido (véanse, por ejemplo, van Tilbeurgh et al., *FEBS Lett.*, 149:152-156 [1982]; y van Tilbeurgh y Claeysens, *FEBS Lett.*, 187:283-288 [1985]).

65 Como se usa en el presente documento, los términos "CBH1" y "celobiohidrolasa tipo 1" se refieren a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio catalítico de la familia 7 de glucosidasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.91 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo de los mismos. En algunas realizaciones, la CBH1 está funcionalmente ligada a un

módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

Como se usa en el presente documento, los términos “CBH2” y “celobiohidrolasa tipo 2” se refieren a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia nucleica que codifica un dominio catalítico de la familia 6 de glucohidrolasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.91 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo de los mismos. Las celobiohidrolasas tipo 2 también se denominan comúnmente “la familia Cel6”. En algunas realizaciones, la CBH2 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a hidrato de carbono (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de la familia 1.

Como se usa en el presente documento, los términos “beta-glucosidasa”, “celobiasa” y “BGL” se refieren a una categoría de celulasas (EC 3.2.1.21) que catalizan la hidrólisis de celobiosa a glucosa. El término “beta-glucosidasa” se define adicionalmente en el presente documento como una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no reductores terminales con la liberación de beta-D-glucosa. La actividad de beta-glucosidasa puede determinarse usando cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, J. Basic Microbiol., 42: 55-66 [2002]). Una unidad de actividad de beta-glucosidasa se define como 1,0 pmol de p-nitrofenol producido por minuto a 40 °C, pH 5 de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido 1 mM como sustrato en citrato de sodio 100 mM que contiene 0,01 % de Tween® 20.

Como se usa en el presente documento, el término “glucósido hidrolasa 61” y “GH61” se refiere a una categoría de celulasas que potencian la hidrólisis de celulosa cuando se usa conjuntamente con una o más celulasas adicionales. La familia de GH61 de celulasas se describe, por ejemplo, en la base de datos Carbohydrate Active Enzymes (CAZY) (véase, por ejemplo, Harris et al., Biochem., 49(15):3305-16 [2010]).

Una “hemicelulasa”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que puede catalizar la hidrólisis de hemicelulosa en polisacáridos pequeños tales como oligosacáridos, o sacáridos monoméricos. Las hemicelulasas incluyen xilano, gluconoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Las hemicelulasas incluyen, por ejemplo, las siguientes: endoxilanasas, beta-xilosidasas, alfa-L-arabinofuranosidasas, alfa-D-glucuronidasas, feruloil esterasas, cumaroil esterasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, beta-mananasas y beta-manosidasas.

Como se usa en el presente documento, los términos “actividad degradadora de xilano” y “actividad xilanolítica” se definen en el presente documento como una actividad biológica que hidroliza material que contiene xilano. Los dos enfoques básicos para medir la actividad xilanolítica incluyen: (1) medir la actividad xilanolítica total, y (2) medir las actividades xilanolíticas individuales (endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, acetilxilano esterasas, feruloil esterasas y alfa-glucuronil esterasas) (véanse, por ejemplo, Biely y Puchard, J. Sci. Food Agr. 86:1636-1647 [2006]; Spanikova y Biely, FEBS Lett., 580:4597-4601 [2006]; y Herrmann et al., Biochem. J., 321:375-381 [1997]).

La actividad degradadora de xilano total puede medirse determinando los azúcares reductores formados a partir de diversos tipos de xilano, que incluyen xilanos de espelta de avena, madera de haya y de madera de alerce, o por determinación fotométrica de fragmentos de xilano teñidos liberados de diversos xilanos covalentemente teñidos. Un ensayo de actividad xilanolítica total común se basa en la producción de azúcares reductores a partir de 4-O-metilglucuronoxilano polimérico (véase, por ejemplo, Bailey et al., J. Biotechnol., 23:257-270 [1992]). En algunas realizaciones, la actividad degradadora de xilano se determina midiendo el aumento en la hidrólisis de xilano de madera de alerce (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, Mo., USA) por enzima(s) degradadora(s) de xilano bajo las siguientes condiciones normales: reacciones de 1 ml, 5 mg/ml de sustrato (sólidos totales), 5 mg de proteína xilanolítica/g de sustrato, acetato sódico 50 mM a pH 5, 50 °C, 24 horas, análisis de azúcar usando el ensayo de hidrazida del ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) (véase, por ejemplo, Lever, Anal. Biochem., 47:273-279 [1972]).

Como se usa en el presente documento, el término “actividad de xilanasa” se refiere a una actividad de 1,4-beta-D-xilano-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endo-hidrólisis de enlaces xilosídicos 1,4-beta-D en xilanos. En algunas realizaciones, la actividad de xilanasa se determina usando xilano de madera de abedul como sustrato. Una unidad de actividad de xilanasa se define como 1,0 μmol de azúcar reductor (medido en equivalentes de glucosa; véase, por ejemplo, Lever, Anal. Biochem., 47:273-279 [1972]) producido por minuto durante el periodo inicial de hidrólisis a 50 °C, pH 5, a partir de 2 g de xilano de madera de abedul por litro como sustrato en acetato sódico 50 mM que contiene 0,01 % de Tween® 20.

Como se usa en el presente documento, el término “actividad de beta-xilosidasa” se refiere a una beta-D-xilósido xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exo-hidrólisis de beta (1→4)-xilooligosacáridos cortos, para eliminar residuos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores. En algunas realizaciones de la presente invención, una unidad de actividad de beta-xilosidasa se define como 1,0 μmol de p-nitrofenol producido por minuto a 40 °C, pH 5, a partir de p-nitrofenil-beta-D-xilósido 1 mM como sustrato en citrato de sodio 100 mM que contiene 0,01 % de Tween® 20.

Como se usa en el presente documento, el término “actividad de acetilxilano esterasa” se refiere a una actividad de carboxilesterasa (EC 3.1.1.72) que cataliza la hidrólisis de grupos acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada,

glucosa acetilada, acetato de alfa-naftilo y acetato de p-nitrofenilo. En algunas realizaciones de la presente invención, la actividad de acetilxilano esterasa se determina usando acetato de p-nitrofenilo 0,5 mM como sustrato en acetato sódico 50 mM a pH 5,0 que contiene 0,01 % de Tween® 20. Una unidad de actividad de acetilxilano esterasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 pmol de anión p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25 °C.

Como se usa en el presente documento, el término "actividad de feruloil esterasa" se refiere a una actividad de 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 normalmente es arabinosa, en sustratos "naturales", para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato). La feruloil esterasa también se conoce como ácido ferúlico esterasa, hidroxicinamoil esterasa, FAE-III, cinamoil éster hidrolasa, FAEA, cinnAE, FAE-I o FAE-II. En algunas realizaciones de la presente invención, la actividad de feruloil esterasa se determina usando ferulato de p-nitrofenilo 0,5 mM como sustrato en acetato sódico 50 mM a pH 5,0. Una unidad de actividad de feruloil esterasa es igual a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de anión p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25 °C.

Como se usa en el presente documento, el término "actividad de alfa-glucuronidasa" se refiere a una actividad de alfa-D-glucosiduronato glucuronohidrolasa (EC 3.2.1.139) que cataliza la hidrólisis de un alfa-D-glucuronósido a D-glucuronato y un alcohol. Una unidad de actividad de alfa-glucuronidasa es igual a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 pmol de ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico por minuto a pH 5, 40 °C (véase, por ejemplo, de Vries, J. Bacteriol., 180:243-249 [1998]).

Como se usa en el presente documento, el término "actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa" se refiere a una actividad de alfa-L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasa (EC 3.2.1.55) que cataliza la hidrólisis de residuos de alfa-L-arabinofuranósido no reductores terminales en alfa-L-arabinósidos. La actividad enzimática actúa sobre alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contienen enlaces (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. La alfa-L-arabinofuranosidasa también se conoce como arabinosidasa, alfa-arabinosidasa, alfa-L-arabinosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa, polisacárido alfa-L-arabinofuranosidasa, alfa-L-arabinofuranósido hidrolasa, L-arabinosidasa y alfa-L-arabinanasa. Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa se determina usando 5 mg de arabinoxilano de trigo de viscosidad media (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irlanda) por ml de acetato sódico 100 mM a pH 5 en un volumen total de 200 μ l durante 30 minutos a 40 °C seguido de análisis de arabinosa por cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., EE.UU.).

La despolimerización enzimática de lignina puede llevarse a cabo por lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas, lacasas y celobiosa deshidrogenasas (CDH), trabajando frecuentemente en sinergia. Estas enzimas extracelulares, esenciales para la degradación de lignina se denominan frecuentemente "enzimas modificadoras de lignina" o "LME". Tres de estas enzimas comprenden dos peroxidasas que contienen hemo glucosiladas: lignina peroxidasa (LiP); peroxidasa dependiente de Mn (MnP); y una fenoloxidasa lacasa que contiene cobre (LCC). Aunque los detalles del esquema de reacción de la biodegradación de lignina no son completamente entendidos hasta la fecha, sin desear quedar ligado a teoría, se sugiere que estas enzimas emplean radicales libres para las reacciones de despolimerización.

Como se usa en el presente documento, el término "lacasa" se refiere a las enzimas oxidasa que contienen cobre que se encuentran en muchas plantas, hongos y microorganismos. Las lacasas son enzimáticamente activas sobre fenoles y moléculas similares y realizan una oxidación de un electrón. Las lacasas pueden ser poliméricas y la forma enzimáticamente activa puede ser un dímero o trímero.

Como se usa en el presente documento, el término "peroxidasa dependiente de Mn" se refiere a peroxidasas que requieren Mn. La actividad enzimática de la peroxidasa dependiente de Mn (MnP) depende de Mn^{2+} . Sin desear quedar ligado a teoría, se ha sugerido que la función principal de esta enzima es oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} (véase, por ejemplo, Glenn et al. Arch. Biochem. Biophys., 251:688-696 [1986]). Posteriormente, los sustratos fenólicos se oxidan por el Mn^{3+} generado.

Como se usa en el presente documento, el término "lignina peroxidasa" se refiere a un hemo extracelular que cataliza la despolimerización oxidativa de disoluciones diluidas de lignina polimérica *in vitro*. Algunos de los sustratos de LiP, en particular alcohol 3,4-dimetoxibencílico (alcohol veratrílico, VA), son compuestos rédox activos que se ha mostrado que actúan de mediadores de rédox. VA es un metalobito secundario producido al mismo tiempo como LiP por cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium* y sin desear quedar ligado a teoría, se ha propuesto que funcionan de mediador rédox fisiológico en la oxidación catalizada por LiP de lignina *in vivo* (véase, por ejemplo, Harvey et al., FEBS Lett. 195:242-246 [1986]).

Como se usa en el presente documento, el término "glucoamilasa" (EC 3.2.1.3) se refiere a enzimas que catalizan la liberación de D-glucosa de extremos no reductores de moléculas de oligo- y poli-sacárido. La glucoamilasa también se considera generalmente un tipo de amilasa conocida como amilo-glucosidasa.

Como se usa en el presente documento, el término "amilasa" (EC 3.2.1.1) se refiere a enzimas que escinden

almidón que degradan almidón y compuestos relacionados hidrolizando los enlaces glucosídicos alfa-1,4 y/o alfa-1,6 en un modo que actúa endo o exo. Las amilasas incluyen alfa-amilasas (EC 3.2.1.1); beta-amilasas (3.2.1.2), amilo-amilasas (EC 3.2.1.3), alfa-glucosidasas (EC 3.2.1.20), pululanasa (EC 3.2.1.41) e isoamilasas (EC 3.2.1.68). En algunas realizaciones, la amilasa es una alfa-amilasa.

5 Como se usa en el presente documento, el término "pectinasa" se refiere a enzimas que catalizan la hidrólisis de pectina en unidades más pequeñas tales como oligosacárido o sacáridos monoméricos. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas comprenden cualquier pectinasa, por ejemplo, una endo-poligalacturonasa, una pectina metil esterasa, una endo-galactanasa, una pectina acetil esterasa, una endo-pectina liasa, pectato liasa, alfa ramnosidasa, una exo-galacturonasa, una exo-poligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa y/o una xilogalacturonasa.

15 Como se usa en el presente documento, el término "endo-poligalacturonasa" (EC 3.2.1.15) se refiere a enzimas que catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces 1,4-alfa-D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también puede denominarse "poligalacturonasa pectina despolimerasa", "pectinasa", "endopoligalacturonasa", "pectolasa", "pectina hidrolasa", "pectina poligalacturonasa", "poli-alfa-1,4-galacturónido glicanohidrolasa", "endogalacturonasa", "endo-D-galacturonasa" o "poli(1,4-alfa-D-galacturónido) glucanohidrolasa".

20 Como se usa en el presente documento, el término "pectina metil esterasa" (EC 3.1.1.11) se refiere a enzimas que catalizan la reacción: pectina + n H₂O = n metanol + pectato. La enzima también puede conocerse como "pectina esterasa", "pectina desmetoxilasa", "pectina metoxilasa", "pectina metilestera", "pectasa", "pectinoestera" o "pectina pectilhidrolasa".

25 Como se usa en el presente documento, el término "endo-galactanasa" (EC 3.2.1.89) se refiere a enzimas que catalizan la endo-hidrólisis de enlaces galactosídicos 1,4-beta-D en arabinogalactanos. La enzima también puede conocerse como "arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa", "endo-1,4-beta-galactanasa", "galactanasa", "arabinogalactanasa" o "arabinogalactano 4-β-D-galactanohidrolasa".

30 Como se usa en el presente documento, el término "pectina acetil esterasa" se refiere a enzimas que catalizan la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de residuos GalUA de pectina.

35 Como se usa en el presente documento, el término "una endo-pectina liasa" (EC 4.2.2.10) se refiere a enzimas que catalizan la escisión eliminativa de éster metílico de (1→4)-alfa-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede conocerse como "pectina liasa", "pectina trans-eliminasa", "endo-pectina liasa", "trans-eliminasa polimetilgalacturónica", "pectina metiltranseliminasa", "pectoliasa", "PL", "PNL", "PMGL", o "(1 →4)-6-O-metil-α-D-galacturonano liasa".

40 Como se usa en el presente documento, el término "pectato liasa" (EC 4.2.2.2) se refiere a enzimas que catalizan la escisión eliminativa de (1 →4)-alfa-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede conocerse como "transeliminasa poligalacturónica", "ácido péptico transeliminasa", "poligalacturonato liasa", "endopectina metiltranseliminasa", "pectato transeliminasa", "endogalacturonato transeliminasa", "ácido péptico liasa", "liasa péptica", "ácido alfa-1,4-D-endopoligalacturónico liasa", "PGA liasa", "PPasa-N", "ácido endo-alfa-1,4-poligalacturónico liasa", "ácido poligalacturónico liasa", "pectina trans-eliminasa", "ácido poligalacturónico trans-eliminasa", o "(1 →4)-alfa-D-galacturonano liasa".

50 Como se usa en el presente documento, el término "alfa-ramnosidasa" (EC 3.2.1.40) se refiere a enzimas que catalizan la hidrólisis de residuos de alfa-L-ramnosa no reductores terminales en alfa-L-ramnósidos o alternativamente en ramnogalacturonano. Esta enzima también puede conocerse como "alfa-L-ramnosidasa T", "alfa-L-ramnosidasa N" o "alfa-L-ramnósido ramnoidrolasa".

55 Como se usa en el presente documento, el término "exo-galacturonasa" (EC 3.2.1.82) se refiere a enzimas que hidrolizan ácido péptico a partir del extremo no reductor, liberando digalacturonato. La enzima también puede conocerse como "exo-poli-alfa-galacturonosidasa", "exopoligalacturonosidasa" o "exopoligalacturanosidasa".

60 Como se usa en el presente documento, el término "exo-galacturano 1,4-alfa galacturonidasa" (EC 3.2.1.67) se refiere a enzimas que catalizan reacciones de los siguientes tipos: (1,4-alfa-D-galacturónido)_n + H₂O = (1,4-alfa-D-galacturónido)_{n-i} + D-galacturonato. La enzima también puede conocerse como "poli [1->4] alfa-D-galacturónido] galacturonohidrolasa", "exopoligalacturonasa", "poli(galacturonato) hidrolasa", "exo-D-galacturonasa", "exo-D-galacturonanasa", "exopoli-D-galacturonasa" o "poli(1,4-alfa-D-galacturónido) galacturonohidrolasa".

65 Como se usa en el presente documento, el término "exopoligalacturonato liasa" (EC 4.2.2.9) se refiere a enzimas que catalizan la escisión eliminativa de 4-(4-desoxi-α-D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor de pectato (es decir, pectina desesterificada). Esta enzima puede conocerse como "pectato disacárido-liasa", "pectato exo-liasa", "ácido exopéptico transeliminasa", "exopectato liasa", "ácido exopoligalacturónico-trans-eliminasa",

“PATE”, “exo-PATE”, “exo-PGL” o “disacárido-liasa de extremos reductores de (1 →4)-alfa-D-galacturonano”.

5 Como se usa en el presente documento, el término “ramnogalacturonanasa” se refiere a enzimas que hidrolizan el enlace entre ácido galactosilurónico y ramnopiranosilo en un modo endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes, que consisten en el disacárido [ácido (1,2-alfa-L-ramnoil-(1,4)-alfa-galactosilurónico)].

Como se usa en el presente documento, el término “ramnogalacturonano liasa” se refiere a enzimas que escinden enlaces alfa-L-Rhap-(1→4)-alfa-D-GalpA en un modo endo en ramnogalacturonano por beta-eliminación.

10 Como se usa en el presente documento, el término “ramnogalacturonano acetil esterasa” se refiere a enzimas que catalizan la desacetilación del esqueleto de residuos alternantes de ramnosa y de ácido galacturónico en ramnogalacturonano.

15 Como se usa en el presente documento, el término “ramnogalacturonano galacturonohidrolasa” se refiere a enzimas que hidrolizan el ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes en un modo exo. Esta enzima también puede conocerse como “xilogalacturonano hidrolasa”.

20 Como se usa en el presente documento, el término “endo-arabinanasa” (EC 3.2.1.99) se refiere a enzimas que catalizan la endo-hidrólisis de enlaces 1,5-alfa-arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también puede conocerse como “endo-arabinasa”, “arabinano endo-1,5- α -L-arabinosidasa”, “endo-1,5-alfa-L-arabinanasa”, “endo-alfa-1,5-arabanasa”, “endo-arabanasa”, o “1,5-alfa-L-arabinano 1,5-alfa-L-arabinanohidrolasa”.

25 Como se usa en el presente documento, “proteasa” incluye enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (peptidasas), además de enzimas que hidrolizan enlaces entre péptidos y otros restos, tales como azúcares (glucopeptidasas). Muchas proteasas se caracterizan bajo EC 3.4, y son adecuadas para su uso en la presente invención. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen, pero no se limitan a, cisteína proteasas que incluyen pepsina, papaína y serina proteasas que incluyen quimotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

30 Como se usa en el presente documento, “lipasa” incluye enzimas que hidrolizan lípidos, ácidos grasos y acilglicéridos, que incluyen fosfoglicéridos, lipoproteínas, diacilgliceroles y similares. En plantas, los lípidos se usan como componentes estructurales para limitar la pérdida de agua y la infección por patógenos. Estos lípidos incluyen ceras derivadas de ácidos grasos, además de cutina y suberina.

35 Como se usa en el presente documento, los términos “aislado” y “purificado” se usan para referirse a una molécula (por ejemplo, un ácido nucleico aislado, polipéptido [que incluye, pero no se limita a, enzimas], etc.) u otro componente que se elimina de al menos otro componente con el que está naturalmente asociado. Se pretende que el término englobe cualquier método adecuado para eliminar al menos un componente con el que la molécula está naturalmente asociado. En algunas realizaciones, los términos también engloban células que se separan de otras células y/o componentes de medio. Se pretende que cualquier método de separación adecuado encuentre uso en la presente invención.

40 Como se usa en el presente documento, el término “proceso de purificación” usado en referencia a una mezcla enzimática engloba cualquier proceso que elimina físicamente un componente no deseado de la mezcla enzimática. Así, en algunas realizaciones, los procesos de purificación proporcionados en el presente documento incluyen metodologías de purificación que eliminan físicamente una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática o viceversa. Se contempla que cualquier proceso de purificación adecuado conocido en la técnica encuentre uso en la presente invención. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún proceso de purificación particular.

45 Como se usa en el presente documento, el término “mezcla enzimática libre de células” comprende enzimas que se han separado de cualquier célula, que incluye las células que secretaron las enzimas. Las mezclas enzimáticas libres de células pueden prepararse por cualquiera de una variedad de metodologías que se conocen en la técnica, tales como metodologías de filtración o centrifugación. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática puede estar, por ejemplo, parcialmente libre de células, sustancialmente libre de células, o completamente libre de células.

50 Como se usa en el presente documento, “polinucleótido” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en tanto forma mono como bicatenaria, y complementos del mismo.

55 Los términos “proteína” y “polipéptido” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos.

60 Además, los términos “aminoácido” “polipéptido” y “péptido” engloban aminoácidos que existen de forma natural y sintéticos, además de análogos de aminoácidos. Los aminoácidos que existen de forma natural son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos aminoácidos que son después modificados (por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina). Como se usa en el presente documento, el término “análogos de aminoácidos” se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que existe

de forma natural (es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, que incluyen, pero no se limitan a, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina y metilsulfonio de metionina). En algunas realizaciones, estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) y/o esqueletos modificados de péptido, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que existe de forma natural.

Los aminoácidos se refieren en el presente documento por cualquiera de sus símbolos comúnmente conocidos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Los nucleótidos, asimismo, pueden denominarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

Una "posición" de aminoácido o de base de nucleótido se indica por un número que identifica secuencialmente cada aminoácido (o base de nucleótido) en la secuencia de referencia basándose en su posición con respecto al extremo N (o extremo 5'). Debido a deleciones, inserciones, truncaciones, fusiones y similares que deben tenerse en cuenta cuando se determina un alineamiento óptimo, el número de residuos de aminoácido en una secuencia de prueba determinada contando simplemente desde el extremo N no será necesariamente el mismo que el número de su posición correspondiente en la secuencia de referencia. Por ejemplo, en un caso en el que una secuencia de prueba tiene una deleción con respecto a una secuencia de referencia alineada, no habrá aminoácido en la variante que se corresponda con una posición en la secuencia de referencia en el sitio de deleción. Si hay una inserción en una secuencia de prueba alineada, esa inserción no se corresponderá con una posición de aminoácido numerada en la secuencia de referencia. En el caso de truncaciones o fusiones pueden ser estiramientos de aminoácidos en tanto la secuencia de referencia como alineada que no se corresponden con ningún aminoácido en la secuencia correspondiente.

Como se usa en el presente documento, los términos "numerado con referencia a" o "correspondiente a", cuando se usan en el contexto de la numeración de una secuencia de aminoácidos o de polinucleótidos dada, se refieren a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia especificada cuando la secuencia de aminoácidos o de polinucleótidos dada se compara con la secuencia de referencia.

Como se usa en el presente documento, el término "enzima de referencia" se refiere a una enzima con la que otra enzima de la presente invención (por ejemplo, una enzima de "prueba") se compara con el fin de determinar la presencia de una propiedad mejorada en la otra enzima que se evalúa. En algunas realizaciones, una enzima de referencia es una enzima no mutante. En algunas realizaciones, la enzima de referencia es una enzima con la que una enzima de prueba de la presente invención se compara con el fin de determinar la presencia de una propiedad mejorada en la enzima de prueba que se evalúa, que incluye, pero no se limita a, termoactividad mejorada, termoestabilidad mejorada y/o estabilidad mejorada. En algunas realizaciones, una enzima de referencia es una enzima tipo mutante.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento biológicamente activo" se refiere a un polipéptido que tiene una deleción (deleciones) del extremo amino y/o del extremo carboxi y/o deleción (deleciones) interna(s), pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia con la que se compara y que retiene sustancialmente toda la actividad del polipéptido de longitud completa.

Como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no se produce naturalmente en una célula huésped. En algunas realizaciones, las moléculas recombinantes contienen dos o más secuencias que existen de forma natural que están ligadas juntas de una forma que no se produce naturalmente. En algunas realizaciones, "células recombinantes" expresan genes que no se encuentran en forma idéntica dentro de la forma nativa (es decir, no recombinante) de la célula y/o expresan genes nativos que son de otro modo anormalmente expresados por exceso, expresados por defecto y/o no se expresan en absoluto debido a intervención humana deliberada. Las células recombinantes contienen al menos un polinucleótido o polipéptido recombinante. Una construcción de ácidos nucleicos, ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido), polipéptido o célula huésped se denomina en el presente documento "recombinante" cuando existe de forma no natural, artificial o manipulada. "Recombinación", "recombinar" y generar un ácido nucleico "recombinado" generalmente engloba el ensamblaje de al menos dos fragmentos de ácido nucleico.

La presente divulgación también proporciona una construcción de ácidos nucleicos recombinante que comprende al menos una secuencia de polinucleótidos de CDH que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 6 y/u 8.

Los ácidos nucleicos "se hibridan" cuando se asocian, normalmente en disolución. Los ácidos nucleicos se hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como enlace de hidrógeno, exclusión de disolvente, apilamiento de bases y similares. Como se usa en el presente documento, el término "condiciones de hibridación / lavado rigurosas" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como hibridaciones Southern y Northern, son dependientes de secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros medioambientales. Un amplia guía a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, 1993, "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes", Parte I, Capítulo 2

(Elsevier, New York). Para polinucleótidos de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de rigurosidad de bajas a muy altas se definen como sigue: prehibridación e hibridación a 42 °C en 5xSSPE, 0,3 % de SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y cualquiera de 25 % de formamida para bajas rigurosidades, 35 % de formamida para rigurosidades medias y medias-altas, o 50 % de formamida para rigurosidades altas y muy altas, siguiendo los procedimientos de transferencia Southern estándar. Para polinucleótidos de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material de vehículo se lava finalmente tres veces cada una durante 15 minutos usando 2xSSC, 0,2 % de SDS a 50 °C (rigurosidad baja), a 55 °C (rigurosidad media), a 60 °C (rigurosidad media-alta), a 65 °C (rigurosidad alta), o a 70 °C (rigurosidad muy alta).

Condiciones moderadamente rigurosas engloban aquellas conocidas en la técnica y descritas en diversos textos estándar e incluyen el uso de disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS). Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas implica incubación durante la noche a 37 °C en una disolución que comprende: 20 % de formamida, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavar los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50 °C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

Como se usa en algunas realizaciones en el presente documento, condiciones rigurosas o condiciones de alta rigurosidad utilizan: (1) fuerza iónica baja y temperatura alta para lavar, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M / citrato de sodio 0,0015 M / 0,1 % de dodecilsulfato de sodio a 50 °C; (2) durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50 % (v/v) de formamida con 0,1 % de albúmina de suero bovino / 0,1 % de Ficoll / 0,1 % de polivinilpirrolidona / tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) 50 % de formamida, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), 0,1 % de SDS y 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y 50 % de formamida a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

Como se usa en el presente documento, "similitud" se refiere a una sustitución de aminoácidos idéntica o conservativa de los mismos como se define más adelante. Por consiguiente, un cambio a una sustitución idéntica o conservativa para los fines de similitud se visualiza como que no comprende un cambio. Una delección de un aminoácido o una sustitución de aminoácidos no conservativa se visualizan en el presente documento como que comprende un cambio. El cálculo de porcentaje de similitud se realiza del mismo modo que se realiza para la identidad en porcentaje. Una sustitución de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución tal como las sustituciones conservativas mostradas en la Tabla A. Las sustituciones mostradas se basan en propiedades fisicoquímicas de aminoácidos, y como tales, son independientes del organismo. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos conservativa es una sustitución enumerada bajo el encabezamiento de sustituciones a modo de ejemplo.

Tabla A. Sustituciones		
Residuo Original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	pro; ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe	Leu
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg

(continuación)

Tabla A. Sustituciones		
Residuo Original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala	Leu

Como se usa en el presente documento, "identidad" e "identidad en porcentaje", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son los mismos (por ejemplo, comparten al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 88 % de identidad, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad) sobre una región especificada para una secuencia de referencia, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual.

En algunas realizaciones, los términos "identidad en porcentaje", "% de identidad", "porcentaje de idénticas" y "% de idénticas" se usan indistintamente en el presente documento para referirse al porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos o de polinucleótidos que se obtiene por el análisis ClustalW (versión W 1.8 disponible de European Bioinformatics Institute, Cambridge, RU), contando el número de coincidencias idénticas en el alineamiento y dividiendo tal número de coincidencias idénticas por la longitud de la secuencia de referencia, y usando los siguientes parámetros de ClustalW para lograr alineamientos óptimos por parejas lentos/más precisos - penalización por abertura de hueco de ADN/proteína: 15/10; penalización por extensión de hueco de ADN/proteína: 6,66/0,1; matriz de peso de proteína: serie de Gonnet; matriz de peso de ADN: Identidad.

Dos secuencias están "alineadas" cuando se alinean para puntuación de similitud usando una matriz de sustitución de aminoácidos definida (por ejemplo, BLOSUM62), penalización por existencia de huecos y penalización por extensión de hueco de manera que lleguen a la mayor puntuación posible para ese par de secuencias. Las matrices de sustitución de aminoácidos y su uso en cuantificar la similitud entre dos secuencias son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Dayhoff et al., en Dayhoff [ed.], Atlas of Protein Sequence and Structure", Vol. 5, Suppl. 3, Natl. Biomed. Res. Round., Washington D.C. [1978]; pp. 345-352; y Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919 [1992]). La matriz BLOSUM62 se usa frecuentemente como una matriz de sustitución de puntuación por defecto en protocolos de alineamiento de secuencias tales como Gapped BLAST 2.0. La penalización por existencia de hueco se impone para la introducción de un hueco de un único aminoácido en una de las secuencias alineadas, y la penalización por extensión de hueco se impone para cada posición de aminoácido adicional insertada en un hueco ya abierto. El alineamiento se define por la posición de aminoácido de cada secuencia en la que el alineamiento empieza y termina, y opcionalmente por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias de manera que lleguen a la mayor puntuación posible. Mientras que el alineamiento y la puntuación óptimos pueden llevarse a cabo manualmente, el proceso se facilita por el uso de un algoritmo de alineamiento implementado por ordenador (por ejemplo, gapped BLAST 2.0; véase Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 [1997]), y puesto a disposición del público en la página web del Centro Nacional para Información Biotecnológica). Pueden hacerse alineamientos óptimos, que incluyen múltiples alineamientos, usando programas fácilmente disponibles tales como PSI-BLAST (véase, por ejemplo, Altschul et al., arriba).

La presente divulgación también proporciona una construcción de ácidos nucleicos recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos de CDH que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y/u 8. Se dice que dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos que tienen el 100 % de identidad de

secuencias son "idénticas". Se dice que una secuencia de ácidos nucleicos o de polipéptidos tiene "identidad de secuencias sustancial" con una secuencia de referencia cuando las secuencias tienen al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencias como se determina usando los métodos descritos en el presente documento, tales como BLAST usando parámetros estándar.

Como se usa en el presente documento, un "péptido señal de secreción" puede ser un propéptido, un prepéptido o ambos. Por ejemplo, el término "propéptido" se refiere a un precursor de proteína que se escinde para dar una "proteína madura". El péptido señal se escinde de la pre-proteína por una peptidasa señal antes de la secreción para producir la proteína "madura" o "secretada". Los términos "prepéptido" y "pre-proteína" se refieren a un polipéptido sintetizado con un péptido señal del extremo N que lo direcciona para la secreción. Por consiguiente, un "pre-pro-péptido" es un polipéptido que contiene un péptido señal que dirige el polipéptido para la secreción y que se escinde para dar un polipéptido maduro. Los péptidos señal se encuentran en el extremo N de la proteína y normalmente están compuestos de entre 6 y 136 aminoácidos básicos e hidrófobos.

Como se usa en el presente documento, "transcripción" y términos similares se refieren a la conversión de la información codificada en un gen a un transcrito de ARN. Por consiguiente, una reducción del nivel de transcripción de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es una reducción en la cantidad de transcrito de ARN de un ARN que codifica una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa.

Como se usa en el presente documento, un "vector" es una construcción de polinucleótido para introducir una secuencia de polinucleótidos en una célula. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de control adecuada operativamente ligada a y capaz de efectuar la expresión del polipéptido codificado en la secuencia de polinucleótidos en un huésped adecuado. Un "vector de expresión" tiene una secuencia promotora operativamente ligada a la secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, transgén) para accionar la expresión en una célula huésped, y en algunas realizaciones una secuencia terminadora de la transcripción. En algunas realizaciones, los vectores son vectores de delección. En algunas realizaciones, los vectores comprenden secuencias de polinucleótidos que producen ARN interferente pequeño o transcritos de ARN antisentido que interfieren con la traducción de una secuencia de polinucleótidos diana.

Como se usa en el presente documento, un "vector de delección" comprende secuencias de polinucleótidos homólogas a una secuencia de polinucleótidos 5' y 3' a una secuencia diana que va a delecionarse de un genoma de huésped para dirigir la recombinación y sustitución de la secuencia diana con un polinucleótido entre las secuencias que eligen diana de 5' y 3'.

Como se usa en el presente documento, el término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción y modificación post-traducciona. En algunas realizaciones, el término también engloba la secreción del polipéptido de una célula. En general, el término "expresión" se refiere a la conversión de la información codificada en un gen en la proteína codificada por ese gen. Así, una "reducción de la cantidad de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa expresada" es una reducción en la cantidad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa que con el tiempo se traduce por la célula.

Como se usa en el presente documento, el término "expresar por exceso" pretende englobar aumentar la expresión de una proteína a un nivel superior al que la célula normalmente produce. Se pretende que el término englobe expresión en exceso de proteínas endógenas, además de heterólogas. En algunas realizaciones, la expresión en exceso incluye una elevada tasa de transcripción y/o nivel del gen en comparación con la tasa de transcripción endógena y/o nivel para ese gen. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un gen heterólogo se introduce en una célula fúngica para expresar un gen que codifica una enzima heteróloga tal como una beta-glucosidasa de otro organismo. En algunas otras realizaciones, un gen heterólogo se introduce en una célula fúngica para expresar en exceso un gen que codifica una enzima homóloga tal como una beta-glucosidasa.

En algunas realizaciones, el gen heterólogo es un gen que ha sido modificado para expresar en exceso el producto génico. En algunas realizaciones, "expresión en exceso" se refiere a cualquier estado en el que se provoca que un gen se exprese a una tasa elevada o nivel en comparación con la tasa de expresión endógena o nivel para ese gen. En algunas realizaciones, la expresión en exceso incluye elevada tasa de traducción y/o nivel del gen en comparación con la tasa de traducción endógena y/o nivel para ese gen. Como se usa en el presente documento, el término "produce" se refiere a la producción de proteínas y/u otros compuestos por células. Se pretende que el término englobe cualquier etapa implicada en la producción de polipéptidos que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción y modificación post-traducciona. En algunas realizaciones, el término también engloba la secreción del polipéptido de una célula.

Como se usa en el presente documento, una "secuencia de polinucleótidos que ha sido adaptada para la expresión"

es una secuencia de polinucleótidos que ha sido insertada en un vector de expresión o modificada de otro modo para contener elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido en la célula huésped, posicionada de tal manera que se permita la expresión del polinucleótido en la célula huésped. Tales elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción y, opcionalmente, secuencias potenciadoras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una secuencia de polinucleótidos se inserta en un vector plasmídico adaptado para la expresión en la célula huésped fúngica.

Como se usa en el presente documento, el término “operativamente ligado” se refiere a una configuración en la que una secuencia de control se pone apropiadamente en una posición con respecto a la secuencia codificante de la secuencia de ADN de forma que la secuencia de control influya en la expresión de un polipéptido.

Como se usa en el presente documento, un aminoácido o secuencia de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia promotora, péptido señal, secuencia terminadora, etc.) es “heteróloga” a otra secuencia con la que está operativamente ligada si las dos secuencias no están asociadas en la naturaleza.

Como se usa en el presente documento, una “enzima heteróloga” se refiere a una enzima que está codificada por un “gen heterólogo”. Sin embargo, también se contempla que un gen heterólogo codifique una enzima endógena u homóloga, como se ha explicado más adelante. En general, el término “gen heterólogo” se refiere a un gen que se produce en una forma no encontrada en una cepa parental de la célula fúngica huésped (que incluye, pero no se limita a, no mutante). Así, en algunas realizaciones, un gen heterólogo es un gen que se deriva de una especie que es diferente de la especie de la célula fúngica que expresa el gen y anamorfos, teleomorfos reconocidos o equivalentes taxonómicos de la célula fúngica que expresa el gen. En algunas realizaciones, un gen heterólogo es una versión modificada de un gen que es endógeno a la célula fúngica huésped, gen endógeno que se ha sometido a manipulación y luego se ha introducido o transformado en la célula huésped. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un gen heterólogo tiene una secuencia codificante endógena, pero tiene modificaciones a la secuencia promotora. Similarmente, en algunas realizaciones, un gen heterólogo codifica la misma secuencia de aminoácidos que un gen endógeno, pero tiene modificaciones al uso de codones o a regiones no codificantes tales como intrones, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un gen heterólogo comprende modificaciones a la secuencia codificante para codificar un polipéptido mutante. En algunas otras realizaciones, un gen heterólogo tiene la misma secuencia promotora, regiones sin traducir 5' y 3' y regiones codificantes que una cepa parental, pero se localiza en otra región del mismo cromosoma, o sobre un cromosoma completamente diferente en comparación con una cepa parental de la célula huésped.

Como se usa en el presente documento, un gen “endógeno” u “homólogo” se refiere a un gen que se encuentra en una cepa parental de la célula fúngica huésped (que incluye, pero no se limita a, no mutante).

Como se usa en el presente documento, el término “introducido”, usado en el contexto de insertar una secuencia de ácidos nucleicos en una célula, significa la transformación, transducción, conjugación, transfección, y/o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica, para insertar secuencias de ácidos nucleicos en células huésped. Cualquier medio adecuado para la introducción de ácido nucleico en células huésped encuentra uso en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, los términos “transformado” y “transformación” usados en referencia a una célula se refieren a una célula que tiene una secuencia no nativa de ácidos nucleicos integrada en su genoma o tiene un plásmido episómico que se mantiene a través de múltiples generaciones.

Como se usa en el presente documento, los términos “célula huésped” y “cepa huésped” se refieren a huéspedes adecuados para vectores de expresión que comprenden secuencias de polinucleótidos (por ejemplo, ADN) como se proporciona en el presente documento. En algunas realizaciones, las células huésped son células procariontas o eucariotas que han sido transformadas o transfectadas con vectores construidos usando técnicas recombinantes como se conoce en la técnica. Los huéspedes transformados son capaces tanto de replicar vectores que codifican al menos una proteína de interés y/o expresar la proteína deseada de interés. Además, referencia a una célula de una cepa particular se refiere a una célula parental de la cepa, además de a la progenie y derivados genéticamente modificados. Los derivados genéticamente modificados de una célula parental incluyen células de progenie que contienen un genoma modificado o plásmidos episómicos que confieren, por ejemplo, resistencia a antibióticos, fermentación mejorada, etc. En algunas realizaciones, las células huésped se modifican genéticamente para tener características que mejoran la secreción de proteínas, estabilidad de proteínas, u otras propiedades deseables para la expresión y/o secreción de una proteína. Por ejemplo, la inactivación de la función de Alp1 produce una célula que es deficiente en proteasa. La inactivación de la función de *pyr5* produce una célula con un fenotipo deficiente en pirimidina. En algunas realizaciones, las células huésped se modifican para deleccionar secuencias codificantes de proteínas celulasas endógenas o de otro modo eliminar la expresión de una o más celulasas endógenas. En algunas realizaciones, la expresión de una o más celulasas endógenas se inhibe para aumentar la producción de celulasas de interés. La modificación genética puede lograrse por cualquier técnica de ingeniería genética y/o técnica microbiológica clásica adecuada (por ejemplo, mutagénesis química o UV y selección posterior). Usando tecnología recombinante, las moléculas de ácidos nucleicos pueden introducirse, deleccionarse, inhibirse o modificarse, de un modo que produzca elevado rendimiento de enzima dentro del organismo o en el cultivo. Por ejemplo, la inactivación

de la función de Alp1 produce una célula que es deficiente en proteasa. La inactivación de la función de *pyr5* produce una célula con un fenotipo deficiente en pirimidina. En algunos enfoques de ingeniería genética, la recombinación homóloga se usa para inducir modificaciones de genes dirigidos dirigiendo específicamente un gen *in vivo* para suprimir la expresión de la proteína codificada. En un enfoque alternativo, la tecnología de ARNip, antisentido y/o de ribozimas encuentra uso en inhibir la expresión génica.

Como se usa en el presente documento, “deleción génica” y “mutación por deleción” se refieren a una mutación en la que parte de un gen está ausente. Así, una deleción es una pérdida o sustitución de material genético que produce una alteración completa o parcial de la secuencia del ADN que constituye el gen. Puede deleccionarse cualquier número de nucleótidos, desde una única base hasta un trozo entero de un cromosoma. En algunas realizaciones se contempla la deleción completa o casi completa de la secuencia del gen. Sin embargo, una mutación por deleción no necesita eliminar completamente la secuencia de genes entera para la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa con el fin de reducir la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena secretada por la célula fúngica. Por ejemplo, una deleción parcial que elimina uno o más nucleótidos que codifican un aminoácido en un sitio activo de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, que codifica una señal de secreción, o que codifica otra porción de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa que desempeña una función en la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que se secreta por la célula fúngica.

Como se usa en el presente documento, una “mutación condicional” es una mutación que tiene fenotipo no mutante bajo ciertas condiciones medioambientales y un fenotipo mutante bajo ciertas otras condiciones.

Como se usa en el presente documento, los términos “amplificación” y “amplificación génica” se refieren a un método por el que secuencias de ADN específicas se replican desproporcionadamente de forma que el gen amplificado se haga presente en un mayor número de copias que el que estaba inicialmente presente en el genoma. En algunas realizaciones, la selección de células por crecimiento en presencia de un fármaco (por ejemplo, un inhibidor de una enzima inhibible) produce la amplificación de cualquier gen endógeno que codifica el producto génico requerido para el crecimiento en presencia del fármaco o por amplificación de secuencias exógenas (es decir, de entrada) que codifican este producto génico, o ambos. La “amplificación” es un caso especial de replicación de ácido nucleico que implica la especificidad por molde. Debe contrastarse con replicación de molde no específica (es decir, replicación que es dependiente del molde pero no dependiente de un molde específico). La especificidad por molde se distingue aquí de la fidelidad de replicación (es decir, síntesis de la secuencia de polinucleótidos apropiada) y especificidad por nucleótido (ribo- o desoxirribo-). La especificidad por molde se describe frecuentemente en términos de especificidad “diana”. Las secuencias diana son “dianas” en el sentido de que son buscadas para ser separadas de otro ácido nucleico. Se han diseñado técnicas de amplificación principalmente para esta separación.

Como se usa en el presente documento, el término “cebador” se refiere a un oligonucleótido, tanto si se produce naturalmente como en un digesto de restricción purificado como se produce sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se pone en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura adecuada y pH). El cebador es preferentemente monocatenario para la máxima eficiencia en amplificación, pero alternativamente puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus hebras antes de usarse para preparar productos de extensión. En algunas realizaciones, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Como se conoce en la técnica, las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, que incluyen temperatura, fuente de cebador y el uso del método.

Como se usa en el presente documento, el término “sonda” se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), tanto que se produce naturalmente como en un digesto de restricción purificado como que se produce sintéticamente, recombinantemente o por amplificación por PCR, que es capaz de hibridarse con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias de genes particulares. Se contempla que cualquier sonda usada en la presente invención se marcará con cualquier “molécula indicadora”, de manera que sea detectable en cualquier sistema de detección, que incluye, pero no se limita a, enzima (por ejemplo, ELISA, además de ensayos histoquímicos basados en enzima), sistemas fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención se limite a ningún sistema de detección o marca particular.

Como se usa en el presente documento, el término “diana”, cuando se usa en referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, se refiere a la región de ácido nucleico unida por los cebadores usados para la reacción en cadena de la polimerasa. Así, se busca que la “diana” se separe de otras secuencias de ácidos nucleicos. Un “segmento” se define como una región de ácido nucleico dentro de la secuencia diana.

Como se usa en el presente documento, el término “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) se refiere a los métodos de las patentes de EE.UU. N.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, que incluyen métodos de aumento de la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este método para amplificar la secuencia diana es muy conocido en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término “reactivos de amplificación” se refiere a aquellos reactivos (trifosfatos de desoxirribonucleótido, tampón, etc.), necesarios para la amplificación, excepto cebadores, molde de ácido nucleico y la enzima de amplificación. Normalmente, los reactivos de amplificación, junto con otros componentes de reacción, se disponen y están contenidos en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

Como se usa en el presente documento, los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

Un “sitio de restricción” se refiere a una secuencia de nucleótidos reconocida y escindida por una endonucleasa de restricción dada y es frecuentemente el sitio para la inserción de fragmentos de ADN. En algunas realizaciones de la invención, los sitios de restricción se manipulan en el marcador selectivo y en los extremos 5' y 3' de la construcción de ADN.

Como se usa en el presente documento, “recombinación homóloga” significa el intercambio de fragmentos de ADN entre dos moléculas de ADN o cromosomas emparejados en el sitio de secuencias de nucleótidos idénticas o casi idénticas. En algunas realizaciones, la integración cromosómica es recombinación homóloga.

Como se usa en el presente documento, el término “C1” se refiere a *Myceliophthora thermophila*, que incluye la cepa fúngica descrita por Garg (véase, Garg, Mycopathol., 30: 3-4 [1966]). Como se usa en el presente documento, “*Chrysosporium lucknowense*” incluye las cepas descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.015.707, 5.811.381 y 6.573.086; publicaciones de patente de EE.UU. N.º 2007/0238155, US 2008/0194005, US 2009/0099079; publicaciones de patente internacional N.º WO 2008/073914 y WO 98/15633, e incluyen, sin limitación, *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K, VKM-F 3500 D (N.º de acceso VKM F-3500-D), cepa de C1 UV13-6 (N.º de acceso VKM F-3632 D), cepa de C1 NG7C-19 (N.º de acceso VKM F-3633 D) y cepa de C1 UV18-25 (VKM F-3631 D), todas las cuales se han depositado en la All-Russian Collection of Microorganisms of Russian Academy of Sciences (VKM), Bakhurhina St. 8, Moscú, Rusia, 113184, y cualquier derivado de las mismas. Aunque inicialmente se describió como *Chrysosporium lucknowense*, C1 puede considerarse actualmente una cepa de *Myceliophthora thermophila*. Otras cepas de C1 incluyen células depositadas bajo los números de acceso ATCC 44006, CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) 122188, CBS 251.72, CBS 143.77, CBS 272.77, CBS122190, CBS122189 y VKM F-3500D. Derivados de C1 a modo de ejemplo incluyen organismos modificados en los que uno o más genes endógenos o secuencias han sido delecionados o modificados y/o uno o más genes heterólogos o secuencias han sido introducidos. Los derivados incluyen, pero no se limitan a, UV18#100f Δalp1, UV18#100f Δpyr5 Δalp1, UV18#100.f Δalp1 Δpep4 Δalp2, UV18#100.f Δpyr5 Δalp1 Δpep4 Δalp2 y UV18#100.f Δpyr4 Δpyr5 Δalp1 Δpep4 Δalp2, como se describen en los documentos WO 2008073914 y WO 2010107303.

Como se usa en el presente documento, una “célula genéticamente modificada” y/o “genéticamente manipulada” (por ejemplo, una “célula fúngica genéticamente manipulada” y/o una “célula fúngica genéticamente modificada”) es una célula cuyo material genético ha sido alterado usando técnicas de ingeniería genética. Una célula genéticamente modificada también se refiere a un derivado de o la progenie de una célula cuyo material genético ha sido alterado usando técnicas de ingeniería genética. Un ejemplo de una modificación genética como resultado de técnicas de ingeniería genética incluye una modificación al ADN genómico; otro ejemplo de una modificación genética como resultado de técnicas de ingeniería genética incluye la introducción de un ácido nucleico heterólogo estable en la célula. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, una célula fúngica genéticamente modificada como se describe en el presente documento es una célula fúngica cuyo material genético ha sido alterado de tal forma que tanto se reduzca la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada, como se reduzca la capacidad de la enzima secretada para oxidar celobiosa o glucosa.

Como se usa en el presente documento, el término “cultivar” se refiere a hacer crecer una población de células microbianas bajo condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. Se contempla que el cultivo se lleve a cabo en cualquier formato adecuado, equipo (por ejemplo, matraces de agitación, tanques de fermentación, biorreactores, etc.). También está previsto que el cultivo se realice usando cualquier método de proceso adecuado, que incluye, pero no se limita a, cultivo discontinuo, de lotes alimentados y/o continuo. De hecho, se contempla que encontrará uso cualquier combinación de métodos adecuados.

En un “proceso discontinuo”, todos los materiales necesarios, con la excepción de oxígeno para procesos aerobios, se disponen en un reactor al inicio de la operación y la fermentación se deja proceder hasta el fin, momento en el que se recoge el producto. En algunas realizaciones, los procesos discontinuos para producir las células fúngicas, enzimas y/o mezclas enzimáticas de la presente invención se llevan a cabo en un matraz con agitación o un biorreactor.

En un “proceso de lotes alimentados”, el cultivo se alimenta continuamente o secuencialmente con uno o más componentes de medio sin la eliminación del fluido de cultivo.

En un "proceso continuo", el medio fresco se suministra y el fluido de cultivo se elimina continuamente a tasas volumétricamente iguales para mantener el cultivo a una tasa de crecimiento estacionaria. En referencia a los procesos continuos, "estado estacionario" se refiere a un estado en el que la concentración de reactantes no varía apreciablemente, y "estado cuasi-estacionario" se refiere a un estado en el que, posterior al inicio de la reacción, la concentración de reactantes fluctúa dentro de un intervalo de acuerdo con la operación normal del proceso de hidrólisis continuo.

Como se usa en el presente documento, el término "sacarificación" se refiere al proceso en el que sustratos (por ejemplo, biomasa celulósica) se degradan mediante la acción de celulasas para producir azúcares fermentables (por ejemplo, monosacáridos tales como, pero no se limitan a, glucosa).

Como se usa en el presente documento, el término "azúcares fermentables" se refiere a azúcares simples (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos cortos), que incluyen, pero no se limitan a, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, manosa y sacarosa. De hecho, un azúcar fermentable es cualquier azúcar que pueda utilizar o fermentar un microorganismo.

Como se usa en el presente documento, el término "azúcares solubles" se refiere a monómeros de pentosa y hexosa solubles en agua y oligómeros de hasta aproximadamente seis unidades de monómero. Se pretende que el término englobe cualquier mono- y/u oligosacárido soluble en agua.

Como se usa en el presente documento, el término "fermentación" se usa ampliamente para referirse al proceso de obtener energía de la oxidación de compuestos orgánicos (por ejemplo, hidratos de carbono). De hecho, la "fermentación" se refiere ampliamente a la conversión química de una fuente de azúcar a un producto final mediante el uso de un organismo de fermentación. En algunas realizaciones, el término engloba el cultivo de un microorganismo o un cultivo de microorganismos que usan azúcares, tales como azúcares fermentables, como fuente de energía para obtener un producto deseado.

Como se usa en el presente documento, el término "organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, que incluye organismos procariotas, además de eucariotas (por ejemplo, organismos bacterianos, además de organismos fúngicos tales como levadura y hongos filamentosos), adecuados para producir un producto final deseado. Los organismos de fermentación especialmente adecuados son capaces de fermentar (es decir, convertir) azúcares, que incluyen, pero no se limitan a, glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y/o arabinosa, directamente o indirectamente en al menos un producto final deseado. En algunas realizaciones, la levadura que encuentra uso en la presente invención incluye, pero no se limita a, cepas del género *Saccharomyces* (por ejemplo, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*), cepas del género *Pichia* (por ejemplo, *Pichia stipitis* tal como *Pichia stipitis* CBS 5773 y *Pichia pastoris*), y cepas del género *Candida* (por ejemplo, *Candida utilis*, *Candida arabinofementans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis* y *Candida boidinii*). Otros organismos de fermentación incluyen, pero no se limitan a, cepas de *Zymomonas*, *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorpha* y *Hansenula anomala*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces fragilis*) y *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*).

Como se usa en el presente documento, el término "suspensión" se refiere a una disolución acuosa en la que se dispersan uno o más componentes sólidos, tales como un sustrato celulósico. Así, el término "suspensión" se refiere a una suspensión de sólidos en un líquido. En algunas realizaciones, el sustrato celulósico se suspende en un líquido a una concentración que es densa, pero todavía puede bombearse. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el líquido es agua, una corriente de proceso recirculada y/o un efluente tratado. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a ningún líquido y/o sólido particular.

Como se usa en el presente documento, "celulosa" se refiere a un polímero del azúcar simple glucosa ligado por enlaces glucosídicos beta-1,4.

Como se usa en el presente documento, "celobiosa" se refiere a un dímero de glucosa ligado por beta-1,4 soluble en agua.

Los términos "biomasa" y "sustrato de biomasa" engloban cualquier material adecuado para su uso en reacciones de sacarificación. Los términos engloban, pero no se limitan a, materiales que comprenden celulosa (es decir, "biomasa celulósica", "materia prima celulósica" y "sustrato celulósico"), además de biomasa lignocelulósica. De hecho, el término "biomasa" engloba cualquier material biológico vivo o muerto que contenga un sustrato de polisacárido, que incluye, pero no se limita a, celulosa, almidón, otras formas de polímeros de hidrato de carbono de cadena larga, y mezclas de tales fuentes. En algunas realizaciones, se ensambla completa o principalmente de glucosa o xilosa, y en algunas realizaciones, opcionalmente también contiene diversos otros monómeros de pentosa y/o hexosa. La biomasa puede derivarse de plantas, animales o microorganismos, e incluye, pero no se limita a, residuos agrícolas, industriales y de silvicultura, residuos industriales y municipales, y cultivos terrestres y acuáticos cultivados para fines de energía. Ejemplos de sustratos de biomasa incluyen, pero no se limitan a, madera, pulpa de madera, pulpa de papel, fibra de maíz, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos tales como cascarillas de maíz, forraje de maíz, céspedes, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, arroz, paja de arroz, césped de pradera, papel usado, residuos del procesamiento del papel y la pulpa, plantas leñosas o herbáceas, pulpa de fruta o

de verdura, residuos de destilería, céspedes, cáscaras de arroz, algodón, cáñamo, lino, sisal, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, césped de pradera, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, astillas de madera, serrín, matorrales y arbustos, verduras, frutas y flores y cualquier mezcla adecuada de los mismos. En algunas realizaciones, la biomasa comprende, pero no se limita a, cultivos cultivados (por ejemplo, céspedes, que incluyen céspedes C4, tales como césped de pradera, pasto, ballico, miscanto, pasto alpiste, o cualquier combinación de los mismos), residuos del procesamiento del azúcar, por ejemplo, pero no se limitan a, bagazo (por ejemplo, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha [por ejemplo, remolacha azucarera], o una combinación de los mismos), residuos agrícolas (por ejemplo, forraje de soja, forraje de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, paja de caña de azúcar, arroz, cáscaras de arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de trigo, paja de canola, paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, cáñamo, lino, sisal, algodón, o cualquier combinación de los mismos), pulpa de fruta, pulpa de verdura, residuos de destilería, biomasa de silvicultura (por ejemplo, madera, pulpa de madera, pulpa de papel, fibra de pulpa de madera reciclada, serrín, madera dura, tal como madera de chopo temblón, coníferas, o una combinación de los mismos). Además, en algunas realizaciones, la biomasa comprende material residual celulósico y/o materiales residuales de silvicultura, que incluyen, pero no se limitan a, residuo del procesamiento del papel y la pulpa, papel usado municipal, papel de periódico, cartón y similares. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una especie de fibra, mientras que en algunas realizaciones alternativas la biomasa comprende una mezcla de fibras que se originan a partir de diferentes biomásas. En algunas realizaciones, la biomasa también comprende plantas transgénicas que expresan enzimas ligninasa y/o celulasa (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0104724 A1).

Como se usa en el presente documento, "lignocelulosa" se refiere a una matriz de celulosa, hemicelulosa y lignina. La producción económica de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica normalmente implica la conversión de los componentes de celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables, normalmente monosacáridos tales como glucosa (a partir de la celulosa) y xilosa y arabinosa (a partir de las hemicelulosas). Puede lograrse conversión casi completa por un pretratamiento químico de la lignocelulosa, seguido de hidrólisis enzimática con enzimas celulasa. La etapa de pretratamiento químico convierte la celulosa más susceptible a la hidrólisis enzimática y, en algunos casos, también hidroliza el componente de hemicelulosa. Se conocen numerosos procesos de pretratamiento químico en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, pretratamiento leve con ácido a altas temperaturas y ácido diluido, pretratamiento con amonio o extracción con disolvente orgánico.

La lignina es un biopolímero más complejo y heterogéneo que cualquier celulosa o hemicelulosa y comprende una variedad de subunidades fenólicas. La despolimerización de lignina enzimática puede llevarse a cabo por lignina peroxidadas, manganeso peroxidadas, lacasas y celobiosa deshidrogenasas (CDH), funcionando frecuentemente en sinergia. Sin embargo, como sugiere el nombre, las enzimas CDH también oxidan celobiosa a celobionolactona. Varios informes indican que la oxidación de celobiosa por CDH potencia la tasa de la hidrólisis de celulosa por celulasas en virtud de reducir las concentraciones de celobiosa, que es un potente inhibidor de algunos componentes de celulosa (Mansfield et al., Appl. Environ. Microbiol., 63: 3804-3809 [1997]; e Igarashi et al., Eur. J. Biochem., 253: 101-106 [1998]). Recientemente se ha informado que las CDH pueden potenciar la actividad de proteínas de potenciamiento celulolítico de la familia glicol hidrolasa 61 (véase, por ejemplo, el documento WO2010/080532A1).

Como se usa en el presente documento, el término "biomasa lignocelulósica" se refiere a cualquier biomasa de planta que comprende celulosa y hemicelulosa, unida a lignina

En algunas realizaciones, la biomasa se pretrata opcionalmente para aumentar la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis por pretratamientos químicos, físicos y biológicos (tales como explosión por vapor, desfibrado, trituración, hidrólisis ácida, exposición a disolvente, y similares, además de combinaciones de los mismos). Diversas materias primas lignocelulósicas encuentran uso, que incluyen aquellas que comprenden materia prima lignocelulósica fresca, materia prima lignocelulósica parcialmente seca, materia prima lignocelulósica completamente seca, y/o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las materias primas lignocelulósicas comprenden celulosa en una cantidad superior a aproximadamente el 20 %, más preferentemente superior a aproximadamente el 30 %, más preferentemente superior a aproximadamente el 40 % (peso/peso). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el material lignocelulósico comprende de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 90 %, (peso/peso) de celulosa, o cualquier cantidad entremedias, aunque en algunas realizaciones el material lignocelulósico comprende menos de aproximadamente el 19 %, menos de aproximadamente el 18 %, menos de aproximadamente el 17 %, menos de aproximadamente el 16 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 14 %, menos de aproximadamente el 13 %, menos de aproximadamente el 12 %, menos de aproximadamente el 11 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 9 %, menos de aproximadamente el 8 %, menos de aproximadamente el 7 %, menos de aproximadamente el 6 %, o menos de aproximadamente el 5 % de celulosa (peso/peso). Además, en algunas realizaciones, la materia prima lignocelulósica comprende lignina en una cantidad superior a aproximadamente el 10 %, más normalmente en una cantidad superior a aproximadamente el 15 % (peso/peso). En algunas realizaciones, la materia prima lignocelulósica comprende pequeñas cantidades de sacarosa, fructosa y/o almidón. La materia prima lignocelulósica se somete generalmente primero a reducción de tamaño por métodos que incluyen, pero no se limitan a, molienda, trituración, agitación, rallado, compresión/expansión, u otros tipos de acción mecánica. La reducción de tamaño por acción mecánica puede realizarse por cualquier tipo de equipo adaptado para el fin, por ejemplo, pero no se limita a, molinos de martillo,

tritadoras de tolva, prensas de rodillos, refinadores e hidrapulper. En algunas realizaciones, al menos el 90 % en peso de las partículas producidas a partir de la reducción de tamaño tienen longitudes inferiores a entre aproximadamente 1/16 y aproximadamente 4 pulgadas (la medición puede ser un volumen o una longitud promedio en peso). En algunas realizaciones, el equipo usado para reducir el tamaño de partícula es un molino de martillo o trituradora. Posterior a la reducción de tamaño, la materia prima normalmente se suspende en agua, ya que esto facilita el bombeo de la materia prima. En algunas realizaciones, las materias primas lignocelulósicas de tamaño de partícula inferior a aproximadamente 6 pulgadas no requieren reducción de tamaño.

Como se usa en el presente documento, el término "materia prima lignocelulósica" se refiere a cualquier tipo de biomasa lignocelulósica que sea adecuada para su uso como materia prima en reacciones de sacarificación.

Como se usa en el presente documento, el término "materia prima lignocelulósica pretratada" se refiere a materias primas lignocelulósicas que han sido sometidas a procesos físicos y/o químicos para hacer la fibra más accesible y/o receptiva a las acciones de las enzimas celulolíticas, como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en el presente documento, los términos "competente para lignocelulosa", "que utiliza lignocelulosa" y términos similares se refieren a un organismo que secreta enzimas que participan en la degradación e hidrólisis de lignina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células fúngicas competentes para lignocelulosa secretan una o más lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas, lacasas y/o celobiosa deshidrogenasas (CDH). Estas enzimas extracelulares, esenciales para la degradación de lignina, se denominan frecuentemente "enzimas modificadoras de lignina" o "LME".

Se dice que un sustrato de biomasa se "pretrata" cuando se ha procesado por algún medio físico y/o químico para facilitar la sacarificación. Como se describe adicionalmente en el presente documento, en algunas realizaciones, el sustrato de biomasa se "pretrata", o se trata usando métodos conocidos en la técnica, tales como pretratamiento químico (por ejemplo, pretratamiento con amoníaco, pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con álcali diluido, o exposición a disolvente), pretratamiento físico (por ejemplo, explosión por vapor o irradiación), pretratamiento mecánico (por ejemplo, trituración o molienda) y pretratamiento biológico (por ejemplo, aplicación de microorganismos solubilizadores de lignina) y combinaciones de los mismos, para aumentar la susceptibilidad de la celulosa a hidrólisis.

En algunas realizaciones, el sustrato se suspende antes del pretratamiento. En algunas realizaciones, la consistencia de la suspensión es entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 30 % y más normalmente entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 15 %. En algunas realizaciones, la suspensión está sometida a una operación de remojo en agua y/o ácido antes del pretratamiento. En algunas realizaciones, la suspensión se desagua usando cualquier método adecuado para reducir el uso de vapor y de productos químicos antes del pretratamiento. Ejemplos de dispositivos de desagüe incluyen, pero no se limitan a, prensas de husillos presurizados (véase, por ejemplo, el documento WO 2010/022511), filtros presurizados y prensas extrusoras.

En algunas realizaciones, el pretratamiento se lleva a cabo para hidrolizar hemicelulosa, y/o una porción de la misma presente en lignocelulosa, dando los azúcares monoméricos pentosa y hexosa (por ejemplo, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, y/o cualquier combinación de las mismas). En algunas realizaciones, el pretratamiento se lleva a cabo de manera que se produzca la hidrólisis casi completa de la hemicelulosa y una pequeña cantidad de conversión de celulosa a glucosa. En algunas realizaciones, normalmente se usa una concentración de ácido en la suspensión acuosa de aproximadamente el 0,02 % (peso/peso) a aproximadamente el 2 % (peso/peso), o cualquier cantidad entremedias, para el tratamiento del sustrato celulósico. Cualquier ácido adecuado encuentra uso en estos métodos, que incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido nítrico y/o ácido sulfúrico. En algunas realizaciones, el ácido usado durante el pretratamiento es ácido sulfúrico. La explosión por vapor es un método de realización del pretratamiento con ácido de sustratos de biomasa (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.461.648). Otro método de pretratamiento de la suspensión implica el pretratamiento continuo (es decir, la biomasa celulósica se bombea a través de un reactor continuamente). Estos métodos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 7.754.457).

En algunas realizaciones, se usa álcali en el pretratamiento. A diferencia del pretratamiento con ácido, el pretratamiento con álcali puede no hidrolizar el componente de hemicelulosa de la biomasa. Más bien, el álcali reacciona con grupos ácidos presentes sobre la hemicelulosa para abrir la superficie del sustrato. En algunas realizaciones, la adición de álcali altera la estructura cristalina de la celulosa de manera que es más susceptible a la hidrólisis. Ejemplos de álcali que encuentran uso en el pretratamiento incluyen, pero no se limitan a, amoníaco, hidróxido de amonio, hidróxido potásico e hidróxido sódico. Un método de pretratamiento con álcali es explosión por congelación con amoníaco, explosión de fibras por amoníaco o expansión de fibras por amoníaco (proceso "AFEX"; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.171.592; 5.037.663; 4.600.590; 6.106.888; 4.356.196; 5.939.544; 6.176.176; 5.037.663; y 5.171.592). Durante este proceso, el sustrato celulósico se pone en contacto con amoníaco o hidróxido de amonio en un recipiente a presión durante un tiempo suficiente para permitir que el amoníaco o hidróxido de amonio altere la estructura cristalina de las fibras de celulosa. La presión se reduce entonces rápidamente, que permite que el amoníaco hierva vigorosamente o hierva y explote la estructura de fibra de celulosa. En algunas realizaciones, el amoníaco que hirvió vigorosamente se recupera entonces usando métodos conocidos

en la técnica. En algunos métodos alternativos se utiliza pretratamiento con amoníaco diluido. El método de pretratamiento con amoníaco diluido utiliza disoluciones más diluidas de amoníaco o hidróxido de amonio que AFEX (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2009/045651 y US 2007/0031953). Este proceso de pretratamiento puede o puede no producir ningún monosacárido.

5 Un proceso de pretratamiento adicional para su uso en la presente invención incluye tratamiento químico del sustrato celulósico con disolventes orgánicos, en métodos tales como aquellos que utilizan líquidos orgánicos en sistemas de pretratamiento (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.556.430). Estos métodos tienen la ventaja de que los líquidos de bajo punto de ebullición pueden recuperarse fácilmente y reutilizarse. Otros pretratamientos, tales como el proceso Organosolv™, también usan líquidos orgánicos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 7.465.791). El someter el sustrato a agua presurizada también puede ser un método de pretratamiento adecuado (véase, por ejemplo, Weil et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 68: 21-40 [1997]). En algunas realizaciones, la biomasa celulósica pretratada se procesa después del pretratamiento por cualquiera de varias etapas, tales como dilución con agua, lavado con agua, tamponamiento, filtración, o centrifugación, o cualquier combinación de estos procesos, antes de la hidrólisis enzimática, como es familiar para aquellos expertos en la materia. El pretratamiento produce una composición de materia prima pretratada (por ejemplo, una "suspensión de materia prima pretratada") que contiene un componente soluble que incluye los azúcares resultantes de la hidrólisis de la hemicelulosa, opcionalmente ácido acético y otros inhibidores, y sólidos que incluyen materia prima sin hidrolizar y lignina. En algunas realizaciones, los componentes solubles de la composición de materia prima pretratada se separan de los sólidos para producir una fracción soluble. En algunas realizaciones, la fracción soluble, que incluye los azúcares liberados durante el pretratamiento y otros componentes solubles (por ejemplo, inhibidores), se envía entonces a fermentación. Sin embargo, en algunas realizaciones en las que la hemicelulosa no se hidroliza eficazmente durante el pretratamiento, se incluyen una o más etapas adicionales (por ejemplo, otra(s) etapa(s) de hidrólisis y/o etapa(s) de tratamiento enzimático y/o adicionalmente tratamiento con álcali y/o ácido) para producir azúcares fermentables. En algunas realizaciones, la separación se lleva a cabo lavando la composición de materia prima pretratada con una disolución acuosa para producir una corriente de lavado y una corriente de sólidos que comprende la materia prima pretratada sin hidrolizar. Alternativamente, el componente soluble se separa de los sólidos sometiendo la composición de materia prima pretratada a una separación de sólidos-líquido, usando cualquier método adecuado (por ejemplo, centrifugación, microfiltración, filtración en placa y marco, filtración de flujo cruzado, filtración a presión, filtración a vacío, etc.). Opcionalmente, en algunas realizaciones, una etapa de lavado se incorpora en la separación de sólidos-líquidos. En algunas realizaciones, los sólidos separados que contienen celulosa se someten entonces a hidrólisis enzimática con enzimas celulasa con el fin de convertir la celulosa en glucosa. En algunas realizaciones, la composición de materia prima pretratada se alimenta en el proceso de fermentación sin separación de los sólidos contenidos en ella. En algunas realizaciones, los sólidos sin hidrolizar se someten a hidrólisis enzimática con enzimas celulasa para convertir la celulosa en glucosa después del proceso de fermentación. En algunas realizaciones, la materia prima celulósica pretratada se somete a hidrólisis enzimática con enzimas celulasa.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

Como se usa en el presente documento, el término "pretratamiento físico" se refiere a cualquier pretratamiento que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina de material celulósico.

Como se usa en el presente documento, el término "pretratamiento mecánico" se refiere a cualquier medio mecánico para tratar biomasa, que incluye, pero no se limita a, diversos tipos de trituración o molienda (por ejemplo, molienda en seco, molienda en húmedo o molino de bolas vibratorio).

Como se usa en el presente documento, el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material celulósico.

Como se usa en el presente documento, el término "recuperado" se refiere a la recogida, aislamiento, recolección o recuperación de proteína de una célula y/o medio de cultivo. En el contexto de la sacarificación, se usa en referencia a la recogida de azúcares fermentables producidos durante la reacción de sacarificación del medio de cultivo y/o células. En el contexto de la fermentación, se usa en referencia a recoger el producto de fermentación del medio de cultivo y/o células. Así, puede decirse que un proceso comprende "recuperar" un producto de una reacción (tal como un azúcar soluble recuperado de sacarificación) si el proceso incluye separar el producto de otros componentes de una mezcla de reacción posterior a al menos algo del producto que se genera en la reacción.

Como se usa en el presente documento, "aumentar" el rendimiento de un producto (tal como un azúcar fermentable) de una reacción se produce cuando un componente particular de interés que está presente durante la reacción (por ejemplo, enzima) hace que se produzca más producto, en comparación con una reacción realizada bajo las mismas condiciones con el mismo sustrato y otros sustituyentes, pero en ausencia del componente de interés (por ejemplo, sin enzima).

Como se usa en el presente documento, se dice que una reacción está "sustancialmente libre" de una enzima particular si la cantidad de esa enzima en comparación con otras enzimas que participan en catalizar la reacción es

menos de aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1 %, o aproximadamente el 0,1 % (peso/peso).

Como se usa en el presente documento, "fraccionar" un líquido (por ejemplo, un caldo de cultivo) significa aplicar un proceso de separación (por ejemplo, precipitación con sales, cromatografía en columna, exclusión por tamaño y filtración) o una combinación de tales procesos para proporcionar una disolución en la que una proteína deseada (por ejemplo, una enzima celulasa, y/o una combinación de la misma) comprende un mayor porcentaje de proteína total en la disolución que en el producto líquido inicial.

Como se usa en el presente documento, el término "hidrólisis enzimática" se refiere a la hidrólisis de un sustrato por una enzima. En algunas realizaciones, la hidrólisis comprende métodos en los que al menos una enzima se pone en contacto con al menos un sustrato para producir un producto final. En algunas realizaciones, los métodos de hidrólisis enzimática comprenden al menos una enzima celulasa y al menos una glucosidasa y/o una mezcla de glucosidasas que actúan sobre los polisacáridos (por ejemplo, celulosa), para convertir toda o una porción de la misma en azúcares fermentables. "Hidrolizar" y/o "hidrólisis" de celulosa u otro polisacárido se produce cuando al menos algunos de los enlaces glucosídicos entre dos monosacáridos presentes en el sustrato se hidrolizan, desprendiéndose así entre sí los dos monómeros que se unieron previamente.

Se pretende que la hidrólisis enzimática se lleve a cabo con cualquier tipo adecuado de enzima(s) capaz de hidrolizar al menos un sustrato a al menos un producto final. En algunas realizaciones, el sustrato es celulosa, mientras que en algunas otras realizaciones, es lignocelulosas, y en todavía más realizaciones, es otra composición (por ejemplo, almidón). En algunas realizaciones, el producto final comprende al menos un azúcar fermentable. Se pretende adicionalmente que la hidrólisis enzimática englobe procesos llevados a cabo con cualquier tipo adecuado de enzimas celulasa capaces de hidrolizar la celulosa a glucosa, independientemente de su fuente. Se pretende que cualquier fuente de enzima adecuada encuentre uso en la presente invención, que incluye, pero no se limita a, enzimas obtenidas de hongos, tales como *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Hypocrea* spp., *Humicola* spp., *Neurospora* spp., *Orpinomyces* spp., *Gibberella* spp., *Emericella* spp., *Chaetomium* spp., *Chrysosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Magnaporthe* spp., *Phanerochaete* spp., *Trametes* spp., *Lentinula edodes*, *Gleophyllum trabeiu*, *Ophiostoma piliferum*, *Corpinus cinereus*, *Geomyces pannorum*, *Cryptococcus laurentii*, *Aureobasidium pullulans*, *Amorphotheca resinae*, *Leucosporidium scotti*, *Cunninghamella elegans*, *Thermomyces lanuginosus*, *Myceliophthora thermophila* y *Sporotrichum thermophile*, además de aquellas obtenidas de las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Thermomyces*, *Clostridium*, *Streptomyces* y *Thermobifida*.

En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a un pH y temperatura que está en o cerca del óptimo para las enzimas celulasa que se usan. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a aproximadamente 30 °C a aproximadamente 75 °C, o cualquier temperatura adecuada entremedias, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, o cualquier temperatura entremedias, y a pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,5, o cualquier pH entremedias (por ejemplo, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, o cualquier pH adecuado entremedias). En algunas realizaciones, la concentración inicial de celulosa antes del inicio de la hidrólisis enzimática es preferentemente aproximadamente 0,1 % (peso/peso) a aproximadamente 20 % (peso/peso), o cualquier cantidad adecuada entremedias (por ejemplo, aproximadamente el 0,1 %, aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 20 %, o cualquier cantidad adecuada entremedias). En algunas realizaciones, la dosificación combinada de todas las enzimas celulasa es aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa, o cualquier cantidad adecuada entremedias (por ejemplo, aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa o cualquier cantidad entremedias). La hidrólisis enzimática se lleva a cabo durante cualquier periodo de tiempo adecuado. En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 200 horas, o cualquier tiempo entremedias (por ejemplo, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 100 horas, o cualquier tiempo adecuado entremedias). Por ejemplo, en algunas realizaciones se lleva a cabo durante aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 7, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 120, aproximadamente 140, aproximadamente 160, aproximadamente 180, aproximadamente 200, o cualquier tiempo adecuado entremedias.

En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática es hidrólisis discontinua, hidrólisis continua, y/o una combinación

de las mismas. En algunas realizaciones, la hidrólisis es agitada, sin mezclar, o una combinación de las mismas. La hidrólisis enzimática normalmente se lleva a cabo en un reactor de hidrólisis. La composición de enzimas celulasa se añade al sustrato lignocelulósico pretratado antes de, durante o después de la adición del sustrato al reactor de hidrólisis. De hecho, no se pretende que las condiciones de reacción se limiten a aquellas proporcionadas en el presente documento, ya que las modificaciones están perfectamente dentro del conocimiento de aquellos expertos en la materia. En algunas realizaciones, tras la hidrólisis de celulosas, cualquier sólido insoluble presente en el hidrolizado lignocelulósico resultante, que incluye, pero no se limita a, lignina, se elimina usando técnicas de separación sólido-líquido convencionales antes de cualquier procesamiento adicional. En algunas realizaciones, estos sólidos se queman para proporcionar energía para el proceso entero.

Como se usa en el presente documento, la “celulosa disponible total” es la cantidad (% en peso) de celulosa que es accesible a la hidrólisis enzimática. La celulosa disponible total normalmente es igual a, o muy próxima a ser igual a, la cantidad de celulosa inicial presente en una reacción de hidrólisis.

Como se usa en el presente documento, la “celulosa residual” es la porción (% en peso) de la celulosa disponible total en la mezcla de hidrólisis que queda sin hidrolizar. La celulosa residual puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, puede medirse directamente usando espectroscopía de IR, o puede medirse determinando la cantidad de glucosa generada por hidrólisis con ácido concentrado de los sólidos residuales.

Como se usa en el presente documento, la “celulosa hidrolizada total” es la porción de la celulosa disponible total que se hidroliza en la mezcla de hidrólisis. Por ejemplo, la celulosa hidrolizada total puede calcularse como la diferencia entre la “celulosa disponible total” y la “celulosa residual”.

Como se usa en el presente documento, el “máximo rendimiento teórico de glucosa” es la cantidad máxima (% en peso) de glucosa que podría producirse bajo condiciones dadas a partir de la celulosa disponible total.

Como se usa en el presente documento, “G_{máx}” se refiere a la cantidad máxima (% en peso) de glucosa que podría producirse a partir de la celulosa hidrolizada total. G_{máx} puede calcularse, por ejemplo, midiendo directamente la cantidad de celulosa residual que queda al final de una reacción bajo condiciones de reacción dadas, restando la cantidad de celulosa residual de la celulosa disponible total para determinar la celulosa hidrolizada total, y luego calculando la cantidad de glucosa que podría producirse a partir de la celulosa hidrolizada total.

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que cuando se calculan valores teóricos tales como G_{máx} y el máximo rendimiento teórico de glucosa, se tienen en cuenta la masa de dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno que se añaden a la molécula de glucosa en el transcurso de la reacción de hidrólisis. Por ejemplo, cuando se hidroliza un polímero de “n” unidades de glucosa, se añaden (n-1) unidades de agua a las moléculas de glucosa formadas en la hidrólisis, así el peso de la glucosa producida es aproximadamente el 10 % superior al peso de celulosa consumida en la hidrólisis (por ejemplo, la hidrólisis de 1 g de celulosa produciría aproximadamente 1,1 g de glucosa).

Así, como un ejemplo, si están presentes 5 g de celulosa disponible total al principio de una reacción de hidrólisis, y quedan 2 g de celulosa residual después de la reacción, la celulosa hidrolizada total es 3 g de celulosa. Un rendimiento teórico máximo de glucosa del 100 % (peso/peso) bajo las condiciones de reacción es aproximadamente 5,5 g de glucosa. G_{máx} se calcula basándose en los 3 g de celulosa que se liberaron o convirtieron en la reacción por la hidrólisis. Así, en este ejemplo, una G_{máx} del 100 % (peso/peso) es aproximadamente 3,3 g de glucosa. Los niveles de celulosa, tanto la cantidad disponible total presente en el sustrato como la cantidad de celulosa sin hidrolizar o residual, pueden cuantificarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como por espectroscopía de IR o midiendo la cantidad de glucosa generada por hidrólisis con ácido concentrado de la celulosa (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.090.595 y 7.419.809).

Como se usa en el presente documento, el término “sólidos sin disolver” se refiere a material sólido que se suspende, pero no se disuelve, en un líquido. Como es muy conocido en la técnica, la concentración de sólidos suspensos o sin disolver puede determinarse por cualquier método adecuado (por ejemplo, filtrando una muestra de la suspensión usando papel de filtro de microfibras de vidrio, lavando la torta de filtración con agua, y secando la torta durante la noche a aproximadamente 105 °C).

Como se usa en el presente documento, los términos “sólidos sin hidrolizar”, “sólidos sin convertir” y similares se refieren a celulosa que no se digiere por la(s) enzima(s) celulasa, además de materiales no celulósicos, u otros materiales que son inertes a la(s) enzima(s) celulasa, presentes en la materia prima.

Como se usa en el presente documento, el término “subproducto” se refiere a una molécula orgánica que es un producto no deseado de un proceso particular (por ejemplo, sacarificación).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona organismos fúngicos y métodos para la conversión de

celulosa a glucosa. En algunas realizaciones, la conversión mejora modificando genéticamente un hongo para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula. Antes de la presente invención, generalmente se creía que esa celobiosa deshidrogenasa potenciaba la tasa de hidrólisis de la celulosa reduciendo la concentración de celobiosa, que es un potente inhibidor de algunos componentes de celulosa (véanse, por ejemplo, Mansfield et al., Appl. Environ. Microbiol., 63: 3804-3809 [1997]; Igarishi et al., Eur. J. Biochem., 253: 101-106 [1998]). Además, se ha informado que la celobiosa deshidrogenasa desempeña una función crítica que contribuye a la mejora sinérgica en la degradación de celulosa, previniendo la inhibición de productos de la hidrólisis (véase, por ejemplo, Hai et al., J. Appl. Glycosci., 49:9-17 [2002]). Como resultado, se ha llevado a cabo la modificación genética de *Trametes versicolor* (véase, Archibald, 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Vol. B: B225-B228 [1998]) y *Coriolus hirsutus* (véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2005/0181485) con el fin de producir sistemas de celulosa con actividades celolíticas reducidas para aplicaciones de pulpa y papel. También se creyó generalmente que la celobiosa deshidrogenasa era útil en deslignificar la lignocelulosa, y así potenciar la degradación de celulosa. Recientemente se ha informado que las celobiosa deshidrogenasas pueden potenciar la actividad de proteínas potenciadoras celolíticas de la familia 61 de glicosil hidrolasa (véase, por ejemplo, el documento WO 2010/080532A1).

Contrario al entendimiento general en la materia, la presente invención proporciona células fúngicas con modificación genética (tal como delección) de genes que codifican enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa en células fúngicas productoras de celulosa que producen una mejora en el rendimiento de azúcares fermentables a partir de mezclas enzimáticas secretadas por las células genéticamente modificadas. Así, la reducción de la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada por un organismo productor de celulosa produce una mezcla de enzimas celulasa que puede mejorar el rendimiento de azúcares fermentables durante la hidrólisis enzimática de sustratos que contienen celulosa.

La presente divulgación proporciona una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y en la que la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que contiene celulasa. También se describe en el presente documento una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula y para aumentar la expresión de al menos una enzima hidrolizante de sacárido, en la que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes, y en la que la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que contiene celulasa. También se describe en el presente documento una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es un basidiomiceto, y en la que la célula fúngica es la célula fúngica capaz de secretar una mezcla enzimática que contiene celulasa. En algunas realizaciones, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena es una celobiosa deshidrogenasa, mientras que en algunas realizaciones alternativas la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena es una enzima distinta de celobiosa deshidrogenasa.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que comprende al menos dos o más enzimas celulasa. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Chrysosporium*, *Coniophora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Humicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*.

La presente divulgación también proporciona una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es una especie de basidiomiceto *Pleurotus*, *Peniophora*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniophora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad de celobiosa deshidrogenasa endógena que es secretada por la célula. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad de glucosa oxidasa endógena que es secretada por la célula. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad de piranosa oxidasa endógena que es secretada por la célula. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad de gluco-oligosacárido oxidasa endógena que es secretada por la célula. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad de piranosa deshidrogenasa endógena que es secretada por la célula. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad de glucosa deshidrogenasa endógena que es secretada por la célula.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Chrysosporium*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o

Thermoascus. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium* o *Talaromyces*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es *Sporotrichum thermophile*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia terrestris*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia heterothallica*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces stipitatus* o *Myceliophthora thermophila*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una célula fúngica aislada.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula. Así, en algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para alterar el péptido señal de secreción de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que se expresa por la célula. Por ejemplo, la célula fúngica puede modificarse genéticamente para alterar una secuencia de iniciación de la traducción o para introducir una mutación del marco de lectura en el transcrito que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas otras realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir el nivel de transcripción de un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. Por ejemplo, la célula fúngica puede modificarse genéticamente para alterar un promotor de un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para delecionar al menos parcialmente un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas otras realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la eficiencia catalítica de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para mutar uno o más residuos en un sitio activo de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para mutar uno o más residuos en un dominio de unión a hemo de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa.

En algunas realizaciones de la divulgación, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4). En algunas otras realizaciones, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18). En algunas otras realizaciones, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10). En algunas otras realizaciones, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es gluco-oligosacárido oxidasa (EC 1.1.99.B3). En algunas realizaciones adicionales, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es piranosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.29). En algunas realizaciones adicionales, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.10). En algunas realizaciones, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % idéntica a SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena que son secretadas por la célula. En ciertas de tales realizaciones, una primera de las dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % idéntica a SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16, y una segunda de las dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, o al menos aproximadamente el 99 % idéntica a SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica comprende además al menos un gen que codifica al menos un enzima que degrada celulosa que es heterólogo a la célula fúngica. Por ejemplo, la célula fúngica puede expresar en exceso un gen homólogo o heterólogo que codifica una enzima que degrada celulosa tal como beta-glucosidasa. En algunas realizaciones, la célula fúngica expresa en exceso beta-glucosidasa y ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula.

La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por una célula fúngica como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula fúngica es una célula que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. En algunas otras realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la actividad de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que

es secretada por la célula y para aumentar la expresión de al menos una enzima hidrolizante de sacárido, en la que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniophora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Humicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*. En algunas realizaciones, la célula fúngica puede ser una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium* o *Chaetomium*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia terrestris*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia heterothallica* o *Myceliophthora thermophila*.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Chrysosporium*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium* o *Chaetomium*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia terrestris*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia heterothallica*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces stipitatus* o *Myceliophthora thermophila*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una célula fúngica aislada.

En algunas realizaciones adicionales de la divulgación, la mezcla enzimática es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones, un sustrato de la mezcla enzimática comprende lignocelulosa pretratada. En algunas realizaciones adicionales, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por un método de tratamiento seleccionado de pretratamiento con ácido, pretratamiento con amoníaco, explosión por vapor, extracción con disolvente orgánico, y/o cualquier otro método de pretratamiento adecuado. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende además una enzima que degrada celulosa que es heteróloga a la célula fúngica. En algunas realizaciones, al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por un célula fúngica aislada.

La divulgación también proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato celulósico con la mezcla enzimática descrita en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en los que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por una célula fúngica como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en los que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por una célula que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, en los que la célula fúngica es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina.

En algunas otras realizaciones de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la actividad de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula y para aumentar la expresión de al menos una enzima hidrolizante de sacárido, en la que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniophora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Humicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium* o *Chaetomium*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia terrestris*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia heterothallica* o *Myceliophthora thermophila*.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium* o *Chaetomium*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia terrestris*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia heterothallica*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces stipitatus* o *Myceliophthora thermophila*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una célula fúngica aislada.

La divulgación proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a un

hongo que es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y en los que la mezcla enzimática se caracteriza porque, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas.

La divulgación también proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a un hongo que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes, y en los que la mezcla enzimática se caracteriza porque, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas.

La presente divulgación proporciona además métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a un hongo de una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium* o *Ctenomyces*, *Scytalidium* o *Thermoascus*, y en los que la mezcla enzimática se caracteriza porque, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con un sustrato de celulosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 %, o el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa resultante de la hidrólisis del sustrato de celulosa se oxida. Por ejemplo, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con un sustrato de celulosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa resultante de la hidrólisis del sustrato de celulosa se oxida para formar celobionolactona, ácido celobiónico, gluconolactona, gluconato o ácido glucónico después de un periodo de tiempo durante el que se produce la hidrólisis. Por ejemplo, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de celobiosa y/o glucosa se oxida después de aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50 o aproximadamente 60 minutos, o después de aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 16, aproximadamente 18, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, aproximadamente 160, aproximadamente 165, aproximadamente

170, aproximadamente 175, aproximadamente 180, aproximadamente 185, aproximadamente 190, aproximadamente 195, aproximadamente 200, aproximadamente 205, aproximadamente 210, aproximadamente 215, aproximadamente 220, aproximadamente 225, aproximadamente 230, aproximadamente 235, aproximadamente 240, aproximadamente 245, aproximadamente 250, aproximadamente 255, aproximadamente 260, aproximadamente 265, aproximadamente 270, aproximadamente 275, aproximadamente 280, aproximadamente 285, aproximadamente 290, aproximadamente 395, aproximadamente 300 horas, o más.

La presente divulgación proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a un hongo que es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y en los que, de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % (% en peso) está presente en forma de celobiosa y/o glucosa.

La presente divulgación también proporciona métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a un hongo que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes, y en los que, de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % (% en peso) está presente en forma de celobiosa y/o glucosa.

En algunas realizaciones, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática está presente en forma de gluconolactona o ácido glucónico. En algunas realizaciones, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática está presente en forma de gluconolactona, ácido glucónico, celobionolactona o ácido celobiónico.

En el presente documento se describen adicionalmente métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a un hongo de una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniophora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*, y en los que, de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % (% en peso) está presente en forma de celobiosa y/o glucosa.

En el presente documento se describen adicionalmente métodos de generación de celobiosa y/o glucosa que comprenden poner en contacto un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa para generar glucosa y/o celobiosa, en los que al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa es endógena a un hongo de una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Humicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*, y en los que, de la

- 5 celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % (% en peso) está presente en forma de celobiosa y/o glucosa.
- 10 En algunas realizaciones de la divulgación, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática está presente en forma de gluconolactona o ácido glucónico. En algunas realizaciones, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática está presente en forma de gluconolactona, ácido glucónico, celobionolactona o ácido celobiónico.
- 15 En algunas realizaciones, los métodos producen un elevado rendimiento de glucosa y/o celobiosa a partir de la celulosa hidrolizada y una reducida oxidación de la glucosa y/o celobiosa a productos de azúcar oxidados, tales como gluconolactona, gluconato, ácido glucónico, celobionolactona y/o ácido celobiónico a partir de la celulosa hidrolizada. En algunas realizaciones, los métodos producen un elevado rendimiento de glucosa y/o celobiosa a partir de la celulosa hidrolizada y una reducida oxidación de la glucosa y/o celobiosa para productos de azúcar oxidados, tales como gluconolactona, gluconato, ácido glucónico, celobionolactona y/o ácido celobiónico a partir de la celulosa hidrolizada, con respecto a una mezcla enzimática con una cantidad sin modificar de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa, o con respecto a una mezcla enzimática parental.
- 20 En algunas realizaciones de la divulgación, la presente invención proporciona métodos de producción de celobiosa y/o glucosa a partir de celulosa que comprenden tratar un sustrato de celulosa con una mezcla enzimática para generar glucosa y/o celobiosa, en los que la mezcla enzimática se modifica con respecto a una mezcla enzimática secretada de una célula fúngica no mutante o de referencia (por ejemplo, parental) para ser al menos parcialmente deficiente en actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa.
- 25 En algunos aspectos de las realizaciones anteriores, la mezcla enzimática es una mezcla libre de células. En algunos otros aspectos, el sustrato de celulosa comprende lignocelulosa pretratada. En algunas realizaciones, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por un método de tratamiento seleccionado de pretratamiento con ácido, pretratamiento con amoníaco, explosión por vapor y extracción con disolvente orgánico.
- 30 En algunos aspectos de las realizaciones anteriores, los métodos comprenden además fermentación de la glucosa a un producto final tal como un alcohol combustible o un producto químico industrial de precursor. En algunos aspectos, el alcohol combustible es etanol o butanol. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el elevado rendimiento de glucosa puede producir menores costes de producción de combustible. En algunos aspectos, los métodos comprenden poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende además una enzima que degrada celulosa que es heteróloga a la célula fúngica.
- 35 En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla enzimática se produce por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula.
- 40 En algunas realizaciones, la mezcla enzimática se somete a un proceso de purificación para eliminar selectivamente una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática. En algunos de tales aspectos, el proceso de purificación comprende precipitación selectiva para separar las enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de otras enzimas presentes en la mezcla enzimática.
- 45 En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende un inhibidor de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, el inhibidor incluye un inhibidor de oxidasa de amplio espectro seleccionado de azida de sodio, cianuro de potasio y varios aniones metálicos tales como Ag⁺, Hg²⁺, Zn²⁺. En algunas realizaciones adicionales, el inhibidor incluye un inhibidor específico de celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18) tal como gentiobiosa, lactobiono-1,5-lactona, celiobono-1,5-lactona, tri-N-acetilquitotriosa, metil-beta-D-celobiosido, 2,2-bipiridina y citocromo C.
- 50
- 55
- 60
- 65

En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla enzimática comprende al menos una beta-glucosidasa. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla enzimática comprende al menos una enzima celulasa seleccionada de endoglucanasas (EG), β -glucosidasas (BGL), celobiohidrolasas tipo 1 (CBH1), celobiohidrolasas tipo 2 (CBH2) y/o glucósido hidrolasas 61 (GH61), y/o variantes de dicha enzima celulasa.

5 La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, siendo al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa endógena a una célula fúngica, en las que la célula fúngica es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina y en las que las mezclas enzimáticas se caracterizan porque, cuando las mezclas enzimáticas se ponen en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas. En algunos aspectos de las realizaciones anteriores, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces* o *Thermoascus*.

20 La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, siendo al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa endógena a una célula fúngica, en las que la célula fúngica es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes y en las que las mezclas enzimáticas se caracterizan porque, cuando las mezclas enzimáticas se ponen en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas.

30 La presente divulgación proporciona además mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, siendo al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa endógena a una célula fúngica, en las que la célula fúngica es *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniophora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*, y en las que las mezclas enzimáticas se caracterizan porque, cuando las mezclas enzimáticas se ponen en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas.

45 La presente divulgación también proporciona mezclas enzimáticas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, siendo al menos una de las enzimas hidrolizantes de celulosa endógena a una célula fúngica, en las que la célula fúngica es *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Humicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*, y en las que las mezclas enzimáticas se caracterizan porque, cuando las mezclas enzimáticas se ponen en contacto con celobiosa y/o glucosa, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida después de 10 horas.

55 En algunos aspectos de las realizaciones anteriores de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas son mezclas libres de células. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas contienen una beta-glucosidasa. En algunas realizaciones adicionales, las mezclas enzimáticas comprenden al menos una enzima celulasa seleccionada de endoglucanasas (EG), β -glucosidasas (BGL), celobiohidrolasas tipo 1 (CBH1), celobiohidrolasas tipo 2 (CBH2) y/o glucósido hidrolasas 61 (GH61), y/o variantes de dicha enzima celulasa.

65 En algunas realizaciones de la divulgación, las mezclas enzimáticas se someten a un proceso de purificación para eliminar selectivamente una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones, el proceso de purificación comprende precipitación selectiva para separar las enzimas oxidantes de

glucosa y/o celobiosa de otras enzimas presentes en la mezcla enzimática. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas comprenden al menos un inhibidor de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa.

5 La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden la célula fúngica de cualquiera de las realizaciones anteriores, y/o que comprenden la mezcla enzimática derivada de la célula fúngica de cualquiera de las realizaciones anteriores.

10 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para la producción de células fúngicas. En algunas realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona métodos para la producción de al menos una enzima de células fúngicas. En algunas realizaciones, estos métodos comprenden métodos de fermentación, que incluyen, pero no se limitan a, proceso discontinuo, proceso continuo, de lotes alimentado y/o una combinación de métodos. En algunas realizaciones, los métodos se realizan en un volumen de reacción de al menos aproximadamente 0,01 ml, aproximadamente 0,1 ml, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 100 ml, aproximadamente 1000 ml, o al menos aproximadamente 10 L, aproximadamente 50 L, aproximadamente 100 l, aproximadamente 200 l, aproximadamente 300 l, aproximadamente 400 l, aproximadamente 500 l, aproximadamente 600 l, aproximadamente 700 l, aproximadamente 800 l, aproximadamente 900 l, aproximadamente 1000 l, aproximadamente 10.000 l, aproximadamente 50.000 l, aproximadamente 100.000 l, aproximadamente 250.000 l, aproximadamente 500.000 l, o superior a aproximadamente 1.000.000 l.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 La presente divulgación proporciona células fúngicas productoras de celulasa genéticamente modificadas que tienen actividad secretada reducida de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena, y que, por tanto, son capaces de secretar mezclas enzimáticas que mejoran el rendimiento de azúcares fermentables de celulosa. Informes previos han indicado que la oxidación de celobiosa por celobiosa deshidrogenasa potencia la tasa de hidrólisis de celulosa por celulasas. A diferencia del pensamiento tradicional en la materia, la presente invención proporciona células fúngicas con delección (delecciones) genómica(s) u otra(s) modificación (modificaciones) genética(s) para reducir la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa que produce rendimiento mejorado de azúcares fermentables de celulosa. Ventajosamente, las células fúngicas productoras de celulasa genéticamente modificadas proporcionadas en el presente documento secretan mezclas enzimáticas que producen rendimientos infinitamente mejorados de azúcares fermentables tales como glucosa a partir de celulosa.

35 Entre los hongos filamentosos productores de celulasa están aquellos que también producen una variedad de enzimas implicadas en la degradación de lignina. Por ejemplo, organismos de géneros tales como *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Sporotrichum*, *Thielavia*, *Phanerochaete* y *Trametes* producen y secretan una mezcla de celulasas, hemicelulasas y enzimas que degradan lignina. Estos tipos de organismos se llaman comúnmente “hongos de la podredumbre blanca” en virtud de su capacidad para digerir lignina y para distinguirlos de los hongos de la “podredumbre marrón” (tales como *Trichoderma*) que normalmente no pueden digerir lignina. Los géneros *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Sporotrichum* y *Thielavia* están estrechamente relacionados y en algunos casos se han usado indistintamente identificadores de géneros/especies diferentes para cepas de las mismas especies (por ejemplo, *M. thermophila* y *S. thermopile*). Los desarrollos en curso en los métodos para establecer la taxonomía de hongos filamentosos han conducido a una reclasificación de algunas cepas de un género a otro o han identificado una relación “anamorfa-teleomorfa” entre cepas de dos géneros (por ejemplo, *M. thermophila* y *T. heterothallica*).

45 La presente divulgación proporciona células, mezclas enzimáticas y métodos en los que la actividad de enzima(s) oxidante(s) de glucosa y/o celobiosa se reduce para mejorar el rendimiento de azúcares fermentables de un proceso de hidrólisis enzimática de celulosa. En vista de esto, como se describe en el presente documento, la presente divulgación proporciona la eliminación o inactivación de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa de una mezcla de enzimas celulasa para mejorar el rendimiento de azúcares fermentables de celulosa o biomasa.

50 Células fúngicas genéticamente modificadas

55 Las células fúngicas genéticamente modificadas proporcionadas en el presente documento permiten una reducción en la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula.

60 En algunas realizaciones de las células fúngicas genéticamente modificadas proporcionadas en el presente documento, la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa que es secretada por la célula se reduce al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o más, con respecto al nivel de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada por la célula fúngica parental sin modificar crecida

o cultivada bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

En algunas realizaciones, la modificación genética produce al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente un 99 % de reducción en la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa total secretada por la célula fúngica.

Se apreciará fácilmente que cualquier modificación genética conocida en la técnica puede emplearse para reducir la actividad secretada de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. Por ejemplo, como se describe más adelante, modificaciones contempladas en el presente documento incluyen modificaciones que reducen la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada por la célula. Adicionalmente se contemplan modificaciones que reducen la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa que se expresa por la célula. Realizaciones adicionales incluyen modificaciones que reducen el nivel de transcripción de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. Todavía más realizaciones incluyen la delección completa o parcial de un gen que codifica enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. Otras realizaciones incluyen modificaciones que reducen la eficiencia catalítica de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa.

Enzima(s) secretada(s). Por consiguiente, en algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula. La enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa que es secretada por una célula es una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa producida por la célula de un modo tal que la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa es exportada a través de una membrana celular y luego posteriormente liberada en el medio extracelular, tal como en medios de cultivo. Así, una reducción en la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada puede ser una reducción completa o parcial de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada al medio extracelular. La reducción en la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada puede llevarse a cabo reduciendo la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa producida por la célula y/o reduciendo la capacidad de la célula para secretar la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa que se produce por la célula. Métodos de reducción de la capacidad de la célula para secretar un polipéptido pueden realizarse según cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fass y Engels, J. Biol. Chem., 271, 15244-15252 [1996]). Por ejemplo, el gen que codifica un polipéptido secretado puede modificarse para delecionar o inactivar un péptido señal de secreción. Así, en algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para alterar el péptido señal de secreción del extremo N de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. La cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa que es secretada por la célula puede reducirse al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o más, con respecto a la secreción de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa en un organismo sin modificar crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

Además, la cantidad total de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa puede reducirse al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más, con respecto a la cantidad total de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada en un organismo sin modificar crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

La disminución de la secreción de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa puede determinarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica para la detección de niveles de proteína o enzima. Por ejemplo, los niveles de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa en el sobrenadante de un cultivo fúngico pueden detectarse usando técnicas de transferencia Western u otras técnicas de detección de proteína que usan un anticuerpo específico para la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. Similarmente, la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada en el sobrenadante de un cultivo fúngico puede medirse usando ensayos para actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa como se describen en mayor detalle en el presente

documento.

Nivel de expresión. En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que se expresa por la célula. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión se lleva a cabo reduciendo la cantidad de ARNm que se transcribe de un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas otras realizaciones, la reducción en la expresión se lleva a cabo reduciendo la cantidad de proteína que es traducida de un ARNm que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa.

La cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa que se expresa por la célula puede reducirse por al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o más, con respecto a la expresión de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa en una célula fúngica sin modificar. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión se lleva a cabo reduciendo la cantidad de ARNm que se transcribe de un gen que codifica celobiosa deshidrogenasa o glucosa oxidasa en un organismo sin modificar crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

Además, en algunas realizaciones, una reducción en el nivel de expresión de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa producirá al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente un 99 % de reducción en el nivel de expresión total de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa por la célula fúngica con respecto a una célula fúngica sin modificar crecida o cultivada bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

La disminución de la expresión de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa puede determinarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica para la detección de niveles de proteína o enzima. Por ejemplo, los niveles de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa en el sobrenadante de un cultivo fúngico pueden detectarse usando técnicas de transferencia Western u otras técnicas de detección de proteína que usan un anticuerpo específico para la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa.

Los métodos de reducción de la expresión de un polipéptido son muy conocidos y pueden realizarse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el gen que codifica un polipéptido secretado puede modificarse para alterar una secuencia de iniciación de la traducción tal como una secuencia de Shine-Delgarno o una secuencia consenso de Kozak. Además, el gen que codifica un polipéptido secretado puede modificarse para introducir una mutación del marco de lectura en el transcrito que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. También se reconocerá que el uso de codones no comunes puede producir expresión reducida de un polipéptido. Se apreciará que en algunas realizaciones el gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa puede tener una mutación terminadora que produce la traducción de una proteína truncada.

Otros métodos de reducción de la cantidad de polipéptido expresado incluyen metodologías de silenciamiento de ARN post-transcripcional tales como ARN antisentido e interferencia por ARN. Las técnicas antisentido están bien establecidas, e incluyen usar una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos del gen. Más específicamente, en algunas realizaciones, la expresión del gen por una célula fúngica se reduce o elimina introduciendo una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos, que se transcribe en la célula y es capaz de hibridarse con el ARNm producido en la célula. En condiciones que permiten que la secuencia de nucleótidos antisentido complementaria se hibride con el ARNm, la cantidad de proteína traducida se reduce o elimina así (véanse, por ejemplo, Ngiam et al., *Appl Environ. Microbiol.*, 66:775-82 [2000]; y Zrenner et al., *Planta* 190:247-52 [1993]).

En algunas realizaciones adicionales de la divulgación, la modificación, regulación por disminución y/o inactivación del gen se logra mediante cualquier técnica de interferencia por ARN (iARN) adecuada (véase, por ejemplo, Kadotani et al. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16:769-76 [2003]). Las metodologías de interferencia por ARN incluyen ARN bicatenario (ARNbc), ARN de horquilla corta (ARNhc) y ARN de interferencia pequeño (ARNip). Puede obtenerse potente silenciamiento usando ARNbc (véase, por ejemplo, Fire et al., *Nature* 391:806-11 [1998]). El silenciamiento usando ARNhc también está muy establecido (véase, por ejemplo, Paddison et al., *Genes*

Dev,16:948-958 [2002]). También se conoce el silenciamiento usando técnicas de ARNip (véase, por ejemplo, Miyagishi et al., Nat. Biotechnol., 20:497-500 [2002]).

Nivel de transcripción. En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir el nivel de transcripción de un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. El nivel de transcripción puede reducirse al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o más, con respecto al nivel de transcripción de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa en un organismo sin modificar crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

Además, una reducción en el nivel de transcripción de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa producirá al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente un 99 % de reducción en la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada total por la célula fúngica con respecto a un organismo sin modificar crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

La disminución de la transcripción puede determinarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica para la detección de los niveles de transcripción. Por ejemplo, los niveles de transcripción de un ARNm particular en una célula fúngica pueden detectarse usando técnicas de RT-PCR cuantitativa u otras técnicas de detección de ARN que detectan específicamente un ARNm particular.

Los métodos de reducción del nivel de transcripción de un gen pueden realizarse según cualquier método conocido en la técnica, e incluyen delección parcial o completa del gen, y alteración o sustitución de un promotor del gen de forma que la transcripción del gen se reduzca enormemente o incluso inhiba. Por ejemplo, un promotor del gen puede sustituirse con un promotor débil (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.933.133). Así, si el promotor débil está operativamente ligado con la secuencia codificante de un polipéptido endógeno, la transcripción de ese gene será enormemente reducida o incluso inhibida.

Delección de genes. En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para delecionar al menos parcialmente un gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones, esta delección reduce o elimina la cantidad total de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena secretada por la célula fúngica.

Una delección en un gen que codifica una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa según las realizaciones descritas en el presente documento puede ser una delección de uno o más nucleótidos en el gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, y es frecuentemente una delección de al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % del gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, en la que la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada por la célula se reduce.

Así, por ejemplo, en algunas realizaciones de la divulgación, la delección produce al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente un 99 % de reducción en la actividad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena secretada por la célula fúngica, con respecto a la actividad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada por un organismo sin modificar crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas

condiciones de cultivo.

Además, en algunas realizaciones de la divulgación, la delección produce al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente un 99 % de reducción en la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada total por la célula fúngica con respecto a una célula fúngica sin modificar crecida o cultivada bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

La delección de un gen de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa puede detectarse y confirmarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica para la detección de delecciones de genes. Por ejemplo, como se ejemplifica en la sección de ejemplos más adelante, la delección de genes puede confirmarse usando amplificación por PCR de la región genómica modificada. Se apreciará que pueden usarse técnicas adicionales para confirmar la delección y son muy conocidas, que incluyen técnicas de transferencia Southern, secuenciación de ADN de la región genómica modificada y cribado para marcadores positivos o negativos incorporados durante eventos de recombinación.

Métodos para la delección completa y/o parcial de un gen son muy conocidos y la célula fúngica genéticamente modificada descrita en el presente documento puede generarse usando cualquiera de una variedad de métodos de delección conocidos en la técnica que permite una reducción en la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula. Tales métodos pueden incluir ventajosamente alteración génica estándar usando marcadores de flanqueamiento homólogos (véase, por ejemplo, Rothstein, Meth. Enzymol., 101:202-211 [1983]). Otra técnica para la delección de genes incluye métodos basados en PCR para la delección estándar (véase, por ejemplo, Davidson et al., Microbiol., 148:2607-2615 [2002], que describe una estrategia basada en PCR para generar alelos de direccionamiento integrativos con grandes regiones de homología).

Técnicas de delección génica adicionales incluyen casetes “positivos-negativos”; delección basada en cre/lox, transformación biolística para aumentar la recombinación homóloga y alteración de genes mediada por *Agrobacterium*. El método “positivo-negativo” emplea casetes que consisten en un gen marcador para el cribado positivo y otro gen marcador para el cribado negativo (véase, por ejemplo, Chang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963 [1987]). Las metodologías basadas en cre/lox emplean eliminación de genes marcadores usando expresión de recombinasa Cre (véase, por ejemplo, Florea et al., Fung. Genet. Biol., 46:721-730 [2009]).

Los métodos de introducción de ADN o ARN en células fúngicas son conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen transformación mediada por PEG de protoplastos, electroporación, transformación biolística y transformación mediada por *Agrobacterium*. La transformación biolística emplea un único proceso en el que ADN o ARN se introduce en células sobre partículas de tamaño de micrómetros, aumentando así la administración de una construcción de delección a la célula fúngica (véase, por ejemplo, Davidson et al., Fung. Genet. Biol., 29:38-48 [2000]). Similarmente, la transformación mediada por *Agrobacterium* conjuntamente con casetes de delección lineales o de marcador interrumpido puede facilitar la administración de construcciones de delección a la célula diana (véase, por ejemplo, Wang et al., Curr. Genet., 56:297-307 [2010]).

Métodos adicionales para la delección de genes completa o parcial incluyen, pero no se limitan a, alteración del gen. Tales técnicas de alteración del gen son conocidas para aquellos expertos en la materia, e incluyen el uso de, por ejemplo, mutagénesis de inserción, el uso de transposones e integración marcada. Sin embargo, se apreciará que cualquier técnica que proporcione alteración de la secuencia codificante o cualquier otro aspecto funcional de un gen puede utilizarse para generar las células fúngicas genéticamente modificadas proporcionadas en el presente documento. Los métodos de mutagénesis de inserción pueden realizarse según cualquier método tal conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Combi et al., FEMS Microbiol. Lett., 220:141-8 [2003]). Por ejemplo, la mutagénesis de inserción mediada por *Agrobacterium* puede usarse para insertar una secuencia que altera la función del gen codificado, tal como alteración de la secuencia codificante o cualquier otro aspecto funcional del gen.

Las metodologías de mutagénesis por transposón son otra forma de alteración de un gen. La mutagénesis por transposón es muy conocida en la técnica, y puede realizarse usando técnicas *in vivo* (véase, por ejemplo, Firon et al., Eukaryot. Cell 2:247-55 [2003]); o por el uso de técnicas *in vitro* (véase, por ejemplo, Adachi et al., Curr Genet., 42:123-7 [2002]). Así, la alteración de genes dirigida usando mutagénesis por transposón puede usarse para insertar una secuencia que altera la función del gen codificado, tal como alteración de la secuencia codificante o cualquier otro aspecto funcional del gen.

La integración mediada por enzima de restricción (REMI) es otra metodología para la alteración de genes, y es muy conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Thon et al., Mol. Plant Microbe Interact., 13:1356-65 [2000]). REMI

genera inserciones en sitios de restricción genómicos de un modo aparentemente aleatorio, algunas de las cuales producen mutaciones. Así, los mutantes de inserción que demuestran una alteración en el gen que codifica la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena pueden seleccionarse y utilizarse como se proporciona en el presente documento.

Alteración catalítica. En algunas otras realizaciones de la divulgación, la célula fúngica se modifica genéticamente para reducir la eficiencia catalítica de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. En algunas realizaciones, una modificación genética que reduce la eficiencia catalítica puede producir, por ejemplo, un producto de proteína traducido que tiene una reducción en la actividad enzimática.

En algunas realizaciones de la divulgación, una reducción en la eficiencia catalítica es una reducción de la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o más, con respecto a enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa sin modificar, como se mide usando técnicas convencionales.

En algunas realizaciones adicionales, la modificación genética produce una reducción de la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de al menos aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente un 99 % de reducción en la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa secretada total por la célula fúngica.

Los métodos de reducción de la eficiencia catalítica de deshidrogenasas y oxidasas son muy conocidos, y como tales, puede utilizarse cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica para reducir la eficiencia catalítica en la modificación genética de las células fúngicas descritas en el presente documento. Así, por ejemplo, la célula fúngica puede modificarse genéticamente para inactivar uno o más residuos en un sitio activo de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa (véase, por ejemplo, Frederik et al., *Biochem.*, 42:4049-4056 [2003]). Por ejemplo, uno o más residuos pueden modificarse para reducir la unión al sustrato, y/o uno o más residuos pueden modificarse para reducir la actividad catalítica de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. Por consiguiente, puede realizarse uno o más residuos en el dominio de unión a aceptor de electrones (por ejemplo, flavina), dominio de unión a sacárido u otro dominio de unión a sustrato de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa para reducir o inactivar la eficiencia catalítica de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. Similarmente, será evidente que la mutación de residuos fuera de un sitio activo puede producir cambio alostérico en la forma o actividad de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa.

En algunas realizaciones adicionales de la divulgación, otros dominios son elegidos como diana por una mutación que produce reducción de la eficiencia catalítica de la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una mutación a uno o más residuos en un dominio de unión a hemo de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa puede producir eficiencia catalítica reducida (véase, por ejemplo, Rotsaert et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 390:206-14 [2001]).

Similarmente, en algunas realizaciones de la divulgación, la modificación genética es una mutación condicional a una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa tiene una mutación sensible a la temperatura que convierte la proteína no funcional (es decir, inactiva o menos activa) a (por ejemplo, temperaturas cálidas, tales como 37-42 °C) y funcional (es decir, activa) a temperaturas más frías.

Células fúngicas

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una célula fúngica que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que contiene celulasa. En algunas realizaciones, la célula fúngica genéticamente modificada descrita en el presente documento es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*,

Trametes, Athelia, Sclerotium, Termitomyces, Flammulina, Coniophora, Ganoderma, Pycnoporus, Ceriporiopsis, Phanerochaete, Gloeophyllum, Hericium, Heterobasidion, Gelatoporia, Lepiota o Irpex. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora, Thielavia, Sporotrichum, Neurospora, Sordaria, Podospora, Magnaporthe, Fusarium, Gibberella, Botryotinia, Humicola, Neosartorya, Pyrenophora, Phaeosphaeria, Sclerotinia, Chaetomium, Nectria, Verticillium* o *Aspergillus*.

La clasificación de una célula fúngica dada como que pertenece a la clase de basidiomicetos Agaricomycetes o a la subdivisión de ascomicetos Pezizomycotina se hace como se reconoce en la materia, como se ejemplifica en la base de datos de taxonomía NCBI.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es un miembro de la familia Chaetomiaceae. La Chaetomiaceae es una familia de hongos en los Ascomycota, clase Sordariomycetes. La familia Chaetomiaceae incluye los géneros *Achaetomium, Aporothielavia, Chaetomidium, Chaetomium, Corilomyces, Corynascus, Farrowia, Thielavia, Zopfiella* y *Myceliophthora*.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica genéticamente modificada es un anamorfo o teleomorfo de un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. En algunas realizaciones, la célula fúngica genéticamente modificada es un anamorfo o teleomorfo de un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de los géneros *Myceliophthora, Thielavia, Corynascus, Chaetomium*. Como tal, la célula fúngica genéticamente modificada también puede seleccionarse de los géneros *Sporotrichum, Chrysosporium, Paecilomyces, Talaromyces* o *Acremonium*. También se contempla que la célula fúngica genéticamente modificada se seleccione de los géneros *Ctenomyces, Thermoascus* y *Scytalidium*, que incluyen anamorfos y teleomorfos de células fúngicas de aquellos géneros.

En algunas realizaciones adicionales de la divulgación, la célula fúngica genéticamente modificada es un miembro termófilo de los géneros *Acremonium, Arthroderma, Corynascus, Thielavia, Myceliophthora, Thermoascus, Chromocleista, Byssochlamys, Sporotrichum, Chaetomium, Chrysosporium, Scytalidium, Ctenomyces, Paecilomyces* y *Talaromyces*. Por "hongo termófilo" se indica cualquier hongo que presenta crecimiento óptimo a una temperatura de al menos aproximadamente 37 °C, y generalmente inferior a aproximadamente 80 °C, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 37-80 °C, también entre aproximadamente 37-75 °C, también entre aproximadamente 40-65 °C, y también entre aproximadamente 40-60 °C. En algunas realizaciones, el crecimiento óptimo se presenta a una temperatura de al menos 40 °-60 °C.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica genéticamente modificada está seleccionado de las cepas de *Sporotrichum cellulophilum, Thielavia heterothallica, Corynascus heterothallicus, Thielavia terrestres* y *Myceliophthora thermophila*, que incluyen anamorfos y teleomorfos de las mismas. Se entenderá que para las especies anteriormente mencionadas, la célula fúngica genéticamente modificada presentada en el presente documento engloba tanto los estados perfectos como imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos (por ejemplo, anamorfos), independientemente del nombre de especie por el que se conozcan. Por ejemplo, las siguientes especies son anamorfos o teleomorfos y pueden, por tanto, considerarse sinónimos: *Myceliophthora thermophila, Sporotrichum thermophile, Sporotrichum thermophilum, Sporotrichum cellulophilum, Chrysosporium thermophile, Corynascus heterothallicus* y *Thielavia heterothallica*. Adicionalmente, las siguientes especies pueden considerarse sinónimas entre sí: *Thielavia terrestres, Allescheria terrestres* y *Acremonium alabamense*. Otros ejemplos de equivalentes taxonómicos se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, Cannon, Mycopathol., 111:75-83 [1990]; Moustafa et al., Persoonia 14:173-175[1990]; Stalpers, Stud. Mycol., 24, [1984]; Upadhyay et al., Mycopathol., 87:71-80 [1984]; Guarro et al., Mycotaxon 23: 419-427 [1985]; Awao et al., Mycotaxon 16:436-440 [1983]; von Klopotek, Arch. Microbiol., 98:365-369 [1974]; y Long et al., ATCC Names of Industrial Fungi, ATCC, Rockville MD [1994]). Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados. Por consiguiente, se entenderá que, a menos que se establezca de otro modo, el uso de una designación de especie particular en la presente divulgación también se refiere a especies que están relacionadas por relación anamórfica o teleomórfica.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica genéticamente modificada es una célula fúngica productora de celulasa que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula fúngica genéticamente modificada es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina que secreta dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, tales como, por ejemplo, endoglucanasa, celobiohidrolasa o beta-glucosidasa. Se apreciará que la celulasa puede incluir enzimas hidrolizantes de hemicelulosa tales como endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, acetilxilano esterasa, feruloil esterasa y alfa-glucuronil esterasa. También se apreciará que una célula fúngica productora de celulasa puede producir dos o más de estas enzimas, en cualquier combinación.

Adicionalmente, en algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica genéticamente modificada se deriva de una célula fúngica parental competente para lignocelulosa. La presente divulgación también proporciona un cultivo fúngico en un recipiente que comprende una célula fúngica genéticamente modificada como se describe anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, el recipiente comprende un medio líquido, tal como medio de fermentación. Por ejemplo, el recipiente puede ser un matraz, reactor de bioproceso y similares. En

algunas realizaciones, el recipiente comprende un medio de crecimiento sólido. Por ejemplo, el medio sólido puede ser un medio de agar tal como agar de dextrosa de patata, carboximetilcelulosa, agar de harina de maíz y similares. En algunas realizaciones, la célula fúngica descrita en el presente documento es una célula fúngica aislada.

5 Enzimas oxidantes de azúcar

La presente divulgación proporciona células fúngicas que han sido genéticamente modificadas para reducir la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena secretada por la célula fúngica. Ejemplos de algunas enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa adecuadas que encuentran uso en la presente divulgación se describen en mayor detalle a continuación.

Glucosa oxidasa. Como se indica en el presente documento, en algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa oxidasa y células fúngicas que producen niveles reducidos de actividad de glucosa oxidasa encuentran uso en la presente divulgación. La glucosa oxidasa es conocida por funcionar mediante un llamado mecanismo de ping-pong de catálisis enzimática, que implica unión sucesiva sobre dos sitios diferentes. Un sitio es un dominio de unión a sacárido que es capaz de unirse a β -D-glucosa. El otro sitio es un sitio de co-sustrato relativamente no selectivo para la unión a un oxidante tal como FAD.

Un experto en la materia apreciará que la actividad enzimática de glucosa oxidasa normalmente emplea la presencia de oxígeno o un aceptor rédox equivalente (por ejemplo, lignina, oxígeno molecular, citocromo C, colorantes rédox, benzoquinonas y complejos de Fe^{2+}). La actividad de glucosa oxidasa (GO) puede medirse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de actividad de GO usando cualquier método adecuado conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, Bergmeyer et al., en *Methods in Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, ed.) Volumen I, 2nd Ed., pp. 457-458, Academic Press Inc., New York, NY [1974]; y la patente de EE.UU. N.º 3.953.295). Por ejemplo, la actividad de GO se determina por un aumento en la absorbancia a 460 nm resultante de la oxidación de o-dianisidina mediante un sistema acoplado a peroxidasa.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona células fúngicas que han sido genéticamente modificadas para reducir la actividad secretada de una glucosa oxidasa y tener actividad secretada reducida de una glucosa oxidasa endógena. Por consiguiente, una o más enzimas glucosa oxidasa de cada una de las especies fúngicas descritas en el presente documento puede ser elegida como diana para la modificación genética.

En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa oxidasa es de una especie fúngica de la división basidiomiceto y que pertenece a la clase Agaricomycetes; o de la división ascomiceto y que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. Algunos ejemplos de enzimas glucosa oxidasa identificadas de la división basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes; y la división ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina se exponen en la Tabla B, más adelante.

En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa oxidasa es de una especie fúngica seleccionada de *Chaetomium globosum*, *Thielavia heterothallica*, *Thielavia terrestris*, *Talaromyces stipitatus* y *Myceliophthora thermophila*. Algunas enzimas glucosa oxidasa identificadas de estas y otras especies se exponen en la Tabla B, más adelante. Las proteínas enumeradas en la Tabla B son ejemplos de glucosa oxidasa que se conocen en la técnica, o se identifican en el presente documento como que son una glucosa oxidasa.

Tabla B. Secuencias de Glucosa Oxidasa

Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
chr1-56652m21GM (SEQ ID NO.: 2)	<i>Myceliophthora thermophila</i>	36-356	495-634
XP_001227361.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	36-355	465-604
JGITHite5217	<i>Thielavia terrestris</i>	36-355	466-605
XP_001223540.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	185-380	514-655
XP_001910674.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	39-373	506-644
XP_001220376.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	38-342	481-620
XP_001226009.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	214-289	323-464
CBI59558.1	<i>Sordaria macrospora</i>	43-373	480-619
XP_383916.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	35-345	466-603
CBI59559.1	<i>Sordaria macrospora</i>	43-356	440-579
JGITHite6377	<i>Thielavia terrestris</i>	40-363	490-630
XP_001549389.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	39-347	438-578
XP_001903685.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	36-337	465-606
XP_002792207.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01	68-290	414-556
XP_003001656.1	<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	46-359	488-627
XP_361250.1	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	113-324	450-594
JGITHite5048	<i>Thielavia terrestris</i>	45-354	480-619
XP_001226113.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	44-353	480-619
XP_001906345.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	39-352	480-620
chr4-293m24GM (SEQ ID NO.: 4)	<i>Myceliophthora thermophila</i>	81-380	508-647
CAJ85791.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	34-344	465-602
XP_661610.1	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	35-346	467-604
XP_003041895.1	<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	35-346	467-604
XP_001912227.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	27-333	443-584
XP_681267.1	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	38-343	471-609
XP_001227424.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	42-374	500-640
CBI58590.1	<i>Sordaria macrospora</i>	46-351	477-588
EEH49925.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18	176-397	NA
XP_001223186.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	37-292	424-599
XP_001791201.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	60-223	349-480
XP_001905375.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	49-370	495-633
XP_001592050.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	227-296	314-446
XP_003002940.1	<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	43-355	462-600
XP_366260.2	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	42-351	491-631
XP_003048882.1	<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	121-295	394-530

(continuación)

Tabla B. Secuencias de Glucosa Oxidasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
XP_001796868.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	38-350	475-615
XP_001805358.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	20-328	454-593
XP_001931252.1	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	23-318	508-595
XP_001218113.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	43-354	475-612
XP_001224467.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	218-318	446-552
XP_003049247.1	<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	25-323	451-589
XP_001906627.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	37-349	473-618
XP_001804484.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	29-319	449-586
JGITHite9772	<i>Thielavia terrestris</i>	33-357	460-599
EEH08138.1	<i>Ajellomyces capsulatus</i> G186AR	181-256	366-509
XP_002565293.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	34-355	458-595
CBI52485.1	<i>Sordaria macrospora</i>	28-338	NA
XP_001273036.1	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	14-322	421-560
AAF31169.1 AF143814_1	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	30-342	446-585
EER39780.1	<i>Ajellomyces capsulatus</i> H143	228-301	411-554
XP_001558188.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	37-358	482-619
XP_001904543.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	27-344	453-596
XP_001544530.1	<i>Ajellomyces capsulatus</i> NAm1	228-301	411-554
JGITHite8281	<i>Thielavia terrestris</i>	5-301	456-624
XP_383802.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	24-324	452-589
XP_001833868.1	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130	35-341	430-568
XP_001836103.1	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130	39-366	462-535
XP_001597615.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	134-290	295-422
ADD14021.1	<i>Pleurotus eryngii</i>	30-342	446-585
EEH50230.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18	131-252	366-484
JGITHite6435	<i>Thielavia terrestris</i>	100-404	509-658
XP_362999.2	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	31-327	431-575
XP_761104.1	<i>Ustilago maydis</i> 521	54-372	485-603
XP_002482522.1	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	36-362	456-593
XP_001879270.1	<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	35-345	451-581
XP_001584680.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	24-335	440-581
XP_001798598.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	35-337	440-584
XP_661816.1	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	33-350	461-599
XP_001883085.1	<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	34-348	450-594
XP_001556658.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	39-364	464-603

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(continuación)

Tabla B. Secuencias de Glucosa Oxidasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
XP_001833865.1	<i>Coprinopsis cinerea okayama7#130</i>	34-345	432-570
XP_002390024.1	<i>Moniliophthora perniciosa FA553</i>	36-298	411-536
XP_001801353.1	<i>Phaeosphaeria nodorum SN15</i>	22-332	436-579
XP_001817515.1	<i>Aspergillus oryzae RIB40</i>	28-335	436-577
XP_568317.1	<i>Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21</i>	55-373	507-643
XP_001273087.1	<i>Aspergillus clavatus NRRL 1</i>	51-369	481-620
XP_002372599.1	<i>Aspergillus flavus NRRL3357</i>	28-340	441-582
XP_001806098.1	<i>Phaeosphaeria nodorum SN15</i>	62-382	494-634
XP_001835456.1	<i>Coprinopsis cinerea okayama7#130</i>	34-345	433-569
XP_001586361.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum 1980</i>	32-346	446-586
XP_001884302.1	<i>Laccaria bicolor S238N-H82</i>	36-348	452-589
XP_001821530.1	<i>Aspergillus oryzae RIB40</i>	75-394	496-635
XP_760191.1	<i>Ustilago maydis 521</i>	59-366	497-628
XP_002375018.1	<i>Aspergillus flavus NRRL3357</i>	53-358	466-631
XP_391162.1	<i>Gibberella zeae PH-1</i>	21-316	442-579
XP_759762.1	<i>Ustilago maydis 521</i>	84-408	530-667
CBI51995.1	<i>Sordaria macrospora</i>	30-326	469-610
XP_002376612.1	<i>Aspergillus flavus NRRL3357</i>	22-321	457-599
XP_660833.1	<i>Aspergillus nidulans FGSC A4</i>	41-358	466-603
EDP53840.1	<i>Aspergillus fumigatus A1163</i>	36-347	448-589
XP_001911514.1	<i>Podospora anserina S mat+</i>	77-396	498-637
XP_002471526.1	<i>Postia placenta Mad-698-R</i>	86-400	517-660
XP_367669.2	<i>Magnaporthe oryzae 70-15</i>	21-323	427-568
XP_001389920.1	<i>Aspergillus niger</i>	5-289	391-528
XP_001732158.1	<i>Malassezia globosa CBS 7966</i>	52-370	481-618
XP_001826806.1	<i>Aspergillus oryzae RIB40</i>	27-338	439-580
XP_001216916.1	<i>Aspergillus terreus NIH2624</i>	26-338	439-580
XP_003000545.1	<i>Verticillium albo-atrum VaMs.102</i>	21-339	440-581
XP_391184.1	<i>Gibberella zeae PH-1</i>	264-389	491-631
XP_002148263.1	<i>Penicillium marneffei ATCC 18224</i>	30-351	469-606
XP_749312.1	<i>Aspergillus fumigatus Af293</i>	36-347	448-589
JGITHite9811	<i>Thielavia terrestris</i>	22-337	440-579
XP_001907031.1	<i>Podospora anserina S mat+</i>	29-322	451-590
XP_001550244.1	<i>Botryotinia fuckeliana B05.10</i>	24-336	451-484
XP_002479433.1	<i>Talaromyces stipitatus ATCC 10500</i>	42-367	467-606

(continuación)

Tabla B. Secuencias de Glucosa Oxidasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
XP_001390806.1	<i>Aspergillus niger</i>	38-356	466-605
XP_681081.1	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	143-367	469-608
XP_001882478.1	<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	33-345	451-588
XP_664049.1	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	36-353	464-603
XP_002373928.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	41-353	465-604
XP_001592756.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	42-358	469-539
YP_914851.1	<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	13-304	394-530
XP_002622246.1	<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081	39-349	459-602
XP_002565328.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	34-338	450-589
XP_001215452.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	46-350	454-589
XP_001820476.1	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	41-343	455-594
XP_001732090.1	<i>Malassezia globosa</i> CBS 7966	55-373	484-621
XP_002388554.1	<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553	46-367	487-624
XP_001265740.1	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	34-345	446-587
XP_381957.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	53-320	432-553
XP_001587168.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	33-351	464-603
XP_660308.1	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	27-334	437-568
YP_001923964.1	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	67-360	428-563
XP_001559357.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	50-370	482-621
XP_002389049.1	<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553	33-345	NA
XP_001394544.1	<i>Aspergillus niger</i>	27-338	439-580
XP_760250.1	<i>Ustilago maydis</i> 521	38-293	419-556
XP_359722.1	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	39-365	476-616
XP_001800211.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	122-375	485-623
XP_002481914.1	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	5-303	416-553
XP_001398576.1	<i>Aspergillus niger</i>	40-353	465-604
XP_003040786.1	<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	61-379	493-631
XP_001904483.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	120-397	510-649
XP_759393.1	<i>Ustilago maydis</i> 521	40-366	478-618
XP_002388140.1	<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553	25-346	NA
XP_002373140.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	43-357	469-603
XP_002143250.1	<i>Penicillium marneffeii</i> ATCC 18224	37-355	466-605
XP_001729093.1	<i>Malassezia globosa</i> CBS 7966	35-351	454-604
XP_001793977.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	25-345	451-587
XP_002476910.1	<i>Postia placenta</i> Mad-698-R	5-307	431-563

(continuación)

Tabla B. Secuencias de Glucosa Oxidasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
XP_001559633.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	33-352	465-604
XP_001732157.1	<i>Malassezia globosa</i> CBS 7966	49-368	480-617
XP_002149622.1	<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	43-324	400-532
XP_001910399.1	<i>Podospora anserina</i> S mat+	51-369	480-620
XP_391404.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	64-382	496-634
XP_002794971.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01	5-300	414-551
XP_001270826.1	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	48-372	484-623
XP_001548196.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	41-349	477-617
XP_001215424.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	41-351	450-591
XP_758019.1	<i>Ustilago maydis</i> 521	36-343	457-608
BAI66412.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	66-382	496-634
EDP52931.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	46-370	482-621
XP_002387978.1	<i>Moniliophthora pemiciosa</i> FA553	224-327	NA
XP_001216137.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	27-340	441-525
XP_002375706.1	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	51-359	471-608
XP_001598641.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	50-370	482-621
gi 71002308 ref XP_755835.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	38-354	466-602
gi 119481873 ref XP_001260965.1	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	38-354	466-605
XP_001817967.1	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	43-357	469-608
XP_001275639.1	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	39-356	468-607
XP_002148584.1	<i>Penicillium marneffei</i> ATCC 18224	54-377	490-629
XP_002485672.1	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	54-377	476-605
EDP55006.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	38-354	466-602
XP_754807.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	46-370	482-621
CBF78527.1	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	21-324	436-575
XP_002556907.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	28-339	NA
XP_002567445.1	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	53-377	485-622
XP_001396848.1	<i>Aspergillus niger</i>	60-366	454-593
XP_001397016.1	<i>Aspergillus niger</i>	51-381	502-641
XP_001023507.1	<i>Tetrahymena thermophila</i>	8-309	403-539
XP_001263633.1	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	46-370	482-621
XP_001400283.1	<i>Aspergillus niger</i>	49-372	477-616
XP_001261659.1	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	44-369	477-612

(continuación)

Tabla B. Secuencias de Glucosa Oxidasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
XP_001797048.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	39-366	458-598
XP_001211074.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	44-320	430-565
XP_001398522.1	<i>Aspergillus niger</i>	50-373	475-614
* Números de acceso para <i>Thielavia terrestris</i> referidos al Departamento de energía (DOE) de EEUU Instituto Asociado de Genoma (JGI) secuencia del genoma			

15 Algunas secuencias de aminoácidos que codifican glucosa oxidasa se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica *Myceliophthora thermophila* GO1 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Myceliophthora thermophila* GO1 se expone como SEQ ID NO: 2. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica *Myceliophthora thermophila* GO2 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Myceliophthora thermophila* GO2 se expone como SEQ ID NO: 4.

25 En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa oxidasa es glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4). En algunas realizaciones, la glucosa oxidasa es una glucosa oxidasa con la secuencia de aminoácidos de *Myceliophthora thermophila* GO1 como se expone en SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la glucosa oxidasa es una glucosa oxidasa con la secuencia de aminoácidos de *Myceliophthora thermophila* GO2 como se expone en SEQ ID NO: 4. En otras realizaciones, la glucosa oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla B. En algunas realizaciones, la glucosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NOS: 1 y/o 3. En algunas realizaciones, la glucosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NOS: 2 y/o 4, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla B. En algunas realizaciones, la glucosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente con SEQ ID NOS: 1 y/o 3 bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas, como se describe más adelante. En algunas realizaciones, la glucosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica SEQ ID NOS: 2 y/o 4, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla B.

60 En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %,

aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NOS: 2 y/o 4, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla B.

Celobiosa deshidrogenasa. En algunas realizaciones de la divulgación, la CDH contiene tanto los dominios oxidorreductasa N de glucosa-metanol-colina (GMC) como los oxidorreductasa C de GMC conservados. En algunas otras realizaciones, una CDH contiene el dominio oxidorreductasa N de GMC solo. Las oxidorreductasas de GMC son flavoproteínas de FAD oxidorreductasas (véanse, por ejemplo, Cavener, J. Mol. Biol., 223:811-814 [1992]; y Vrielink y Blow, Biochem., 32:11507-15 [1993]). Las oxidorreductasas de GMC incluyen una variedad de proteínas; colina deshidrogenasa (CHD), metanol oxidasa (MOX) y celobiosa deshidrogenasa (CDH) que comparten varias regiones de similitudes de secuencia. Una de estas regiones, localizada en la sección del extremo N, se corresponde con el dominio de unión de ADP FAD, como se define adicionalmente por la base de datos Pfam bajo la entrada GMC_oxred_N (PF00732). Similarmente, el dominio conservado del extremo C (dominio oxidorreductasa C de GMC) se define como se expone en la base de datos Pfam bajo la entrada GMC_oxred_C (PF05199).

Las celobiosa deshidrogenasas pueden clasificarse en dos familias, en las que una primera familia contiene una porción catalítica y una segunda familia contiene una porción catalítica y un motivo de unión de celulosa (CBM). La estructura tridimensional de una celobiosa deshidrogenasa de ejemplo caracteriza dos dominios globulares, cada uno de los cuales contiene uno de dos cofactores: un hemo o una flavina. El sitio activo se encuentra en una hendidura entre los dos dominios. La oxidación de celobiosa normalmente se produce mediante la transferencia de 2 electrones de celobiosa a la flavina, generando celobiono-1,5-lactona y flavina reducida. El FAD activo se regenera por transferencia de electrones al grupo hemo, dejando un hemo reducido. El hemo en estado nativo se regenera mediante reacción con el sustrato oxidante en el segundo sitio activo.

El aceptor es preferencialmente ferricianuro de hierro, citocromo C, o un compuesto fenólico oxidado tal como dicloroindofenol (DCIP), un aceptor comúnmente usado para ensayos colorimétricos. Los iones metálicos y O₂ también son aceptores, pero para la mayoría de las celobiosa deshidrogenasas la tasa de reacción de celobiosa oxidasa para estos aceptores es de varios órdenes de magnitud menor que la observada para hierro u oxidantes orgánicos. Tras la liberación de celobionolactona, el producto puede experimentar apertura de anillo espontánea para generar ácido celobiónico (Hallberg et al., 2003, J. Biol. Chem. 278: 7160-7166).

Aquellos expertos en la materia apreciarán que la actividad enzimática de celobiosa deshidrogenasa normalmente emplea la presencia de oxígeno o un aceptor rédox equivalente (por ejemplo, lignina, oxígeno molecular, citocromo C, colorantes rédox, benzoquinonas y complejos de Fe²⁺).

La actividad de celobiosa deshidrogenasa puede medirse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de actividad de CDH usando cualquier método adecuado conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Schou et al., Biochem J., 220:565-71 [1998]). Por ejemplo, la reducción de DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) por actividad de CDH en presencia de celobiosa puede monitorizarse por absorbancia a 530 nm.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células fúngicas proporcionadas en el presente documento que han sido genéticamente modificadas para reducir la actividad secretada de una celobiosa deshidrogenasa tienen actividad secretada reducida de una celobiosa deshidrogenasa endógena. Por consiguiente, una o más enzimas celobiosa deshidrogenasa de cada una de las especies fúngicas descritas en el presente documento puede ser elegida como diana para la modificación genética.

En algunas realizaciones de la divulgación, la celobiosa deshidrogenasa es de una especie fúngica en la división basidiomiceto y que pertenece a la clase Agaricomycetes; o en la división ascomiceto y que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. Algunos ejemplos de enzimas celobiosa deshidrogenasa identificadas de la división basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes; y la división ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina se exponen en la Tabla C, más adelante.

En algunas realizaciones de la divulgación, la celobiosa deshidrogenasa es de una especie fúngica seleccionada de *Thielavia heterothallica*, *Thielavia terrestris*, *Chaetomium globosum* y *Myceliophthora thermophila*. Algunas enzimas celobiosa deshidrogenasa identificadas de estas y otras especies se exponen en la tabla a continuación. Las proteínas enumeradas en la Tabla C son ejemplos de celobiosa deshidrogenasa que se conocen en la técnica, o se identifican en el presente documento como que son una celobiosa deshidrogenasa.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla C. Secuencias de Celobiosa Deshidrogenasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
AC26221 (SEQ ID NO.: 6)	<i>Myceliophthora thermophila</i>	251-554	645-781
AAC26221	<i>Myceliophthora thermophila</i>	251-554	645-781
ABS45566	<i>Myriococcum thermophilum</i>	251-554	645-781
ABS45567	<i>Myriococcum thermophilum</i>	251-554	645-781
CHGT_03380	<i>Chaetomium globosum</i>	226-529	620-757
XP_001229896.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	226-529	620-757
JGITHite5441	<i>Thielavia terrestris</i>	253-555	647-783
CAP68427	<i>Podospora anserina</i>	247-550	643-779
CBI53519.1	<i>Sordaria macrospora</i>	252-554	645-782
XP_956591.1	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	253-555	646-782
XP_360402.2	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	264-566	657-794
EDP55266	<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	265-568	661-796
BAE61169	<i>Aspergillus oryzae</i>	254-556	647-782
CBI59551.1	<i>Sordaria macrospora</i>	167-295	382-518
EAW14611	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	254-556	647-783
XP_001209295.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	253-474	586-720
JGITHite4524	<i>Thielavia terrestris</i>	36-337	NA
CHGT_08276	<i>Chaetomium globosum</i>	36-338	NA
XP_001225932.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	36-338	NA
JGITHite6738	<i>Thielavia terrestris</i>	249-550	642-779
CAP61651	<i>Podospora anserina</i>	254-555	647-783
AAF69005	<i>Humicola insolens</i>	247-548	640-776
XP_389261.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	213-516	607-743
XP_958234.1	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	274-576	668-804
CDH2 derivado de la cadena C1 (Secuencia Id. No.:8)	<i>Myceliophthora thermophila</i>	249-550	NA
CBI54739.1	<i>Sordaria macrospora</i>	272-574	666-802
XP_001800470.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	36-343	366-502
XP_001939778.1	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	247-550	640-776
CHGT_08622	<i>Chaetomium globosum</i>	249-521	549-667
XP_001226549.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	249-521	549-667
XP_001801490.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	245-543	633-769
XP_001553707.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	265-570	656-796

(continuación)

Tabla C. Secuencias de Celobiosa Deshidrogenasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
XP_002999803.1	<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	393-534	590-681
XP_001591237.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	265-570	655-796
XP_001273175.1	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	244-543	627-752
XP_749254.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	247-546	637-755
ACF60617	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	236-519	634-763
BAC20641	<i>Grifola frondosa</i>	230-509	628-757
AAC50004	<i>Trametes versicolor</i>	230-512	628-757
BAD32781	<i>Coniophora puteana</i>	236-519	634-763
XP_367658.1	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	39-334	426-551
BAD36748	<i>Irpex lacteus</i>	239-516	637-766
AAB61455	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	235-517	633-762
CAA61359	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	234-516	632-761
AAO32063	<i>Trametes versicolor</i>	230-512	628-757
AAO64483	<i>Athelia rolfsii</i>	233-520	631-760
XP_001265679.1	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	247-546	639-755
AAC32197	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	231-517	628-758
XP_383093.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	27-325	408-528
2118247A	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	234-515	631-759
XP_001937164.1	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	245-542	625-754
XP_001400060.1	<i>Aspergillus niger</i>	33-329	415-542
CAP85828	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	30-327	393-537
XP_001803287.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	243-516	NA
XP_003006847.1	<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	27-317	411-529
XP_001402432.1	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	245-495	598-726
XP_003042062.1	<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	241-540	597-754
XP_001210806.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	32-329	413-541
XP_386159.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	25-323	406-530
BAE63115	<i>Aspergillus oryzae</i>	24-317	401-527
XP_001559563.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	232-534	620-746
XP_003003908.1	<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	232-507	NA
XP_003042935.1	<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	233-531	614-739
XP_383918.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	234-533	615-740

(continuación)

Tabla C. Secuencias de Celobiosa Deshidrogenasa			
Número de acceso	Organismo	Dominio GMC oxred N	Dominio GMC oxred C
XP_001793048.1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	28-314	408-542
BAE79276	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	27-325	408-532
XP_364344.1	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	49-321	426-560
XP_001547235.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	30-313	422-548
XP_001593342.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	232-536	622-748
XP_385048.1	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	239-538	595-752
XP_362950.1	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	30-327	415-537
XP_003052041.1	<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	32-332	415-539
XP_001940494.1	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	90-271	363-479
* Números de acceso para <i>Thielavia terrestris</i> referidos al Departamento de energía (DOE) de EEUU Instituto Asociado de Genoma (JGI) secuencia del genoma			

Algunas secuencias de aminoácidos que codifican celobiosa deshidrogenasa se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica *Myceliophthora thermophila* CDH1 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Myceliophthora thermophila* CDH1 se expone como SEQ ID NO: 6. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica *Myceliophthora thermophila* CDH2 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos codificada de *Myceliophthora thermophila* CDH2 se expone como SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones de la divulgación, la celobiosa deshidrogenasa es celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18). En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa es una celobiosa deshidrogenasa con la secuencia de aminoácidos de *Myceliophthora thermophila* CDH1 como se exponen en SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa es una celobiosa deshidrogenasa con la secuencia de aminoácidos de *Myceliophthora thermophila* CDH2 como se expone en SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla C. En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NOS: 5 y/o 7. En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NOS: 6 y/o 8, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla D. En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente con SEQ ID NOS: 5 y/o 7 bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas, como se describe anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, la celobiosa

deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica SEQ ID NOS: 6 y/u 8, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla C.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, la celobiosa deshidrogenasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NOS: 6 y/u 8, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla C. Similitud como se usa en el presente documento se describe en mayor detalle anteriormente en este documento.

25 Las secuencias de celobiosa deshidrogenasa pueden identificarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un alineamiento de secuencias contra una base de datos, por ejemplo, contra la base de datos NCBI, y pueden seleccionarse secuencias con el menor valor E de HMM.

30 **Piranosas oxidadas.** Como se indica en el presente documento, piranosas oxidadas y células fúngicas que han sido modificadas para tener actividad de piranosas oxidadas reducidas encuentran uso en la presente divulgación. La actividad de piranosas oxidadas puede medirse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de actividad de PO como se describe por Leitner et al., Appl Biochem Biotechnol 1998, 70-72:237-248), que se incorpora por referencia en su totalidad. Por ejemplo, puede monitorizarse la reducción de ácido 2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinsulfónico) (ABTS) por actividad de PO por absorbancia a 530 nm. En algunas realizaciones adicionales, la actividad de PO se determina por un aumento en la absorbancia a 420 nm resultante de la oxidación del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolinsulfónico) (ABTS) mediante un sistema acoplado a peroxidasa.

40 En algunas realizaciones de la divulgación, las células fúngicas proporcionadas en el presente documento que han sido genéticamente modificadas para reducir la actividad secretada de una piranosas oxidadas tienen actividad secretada reducida de una piranosas oxidadas endógena. Por consiguiente, una o más enzimas piranosas oxidadas de cada una de las especies fúngicas descritas en el presente documento puede ser elegida como diana para la modificación genética.

45 En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosas oxidadas es de una especie fúngica en la división basidiomiceto y que pertenece a la clase Agaricomycetes; o en la división ascomiceto y que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. Algunos ejemplos de enzimas piranosas oxidadas identificadas de la división basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes; y la división ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina se exponen en Tabla D, más adelante.

50 En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosas oxidadas es de una especie fúngica seleccionada de *Peniophora gigantea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes ochracea*, *Trametes pubescens*, *Emericella nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Gloeophyllum trabeum*, *Tricholoma matsutake*, *Trametes hirsute*, *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Peniophora sp.*, *Trametes versicolor*, *Lyophyllum shimeji*, *Trametes pubescens*, *Phlebiopsis gigantea*, *Aspergillus parasiticus*, *Auricularia polytricha*, *Coriolus hirsutus*, *Coriolus versicolor*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Iridophycus faccidum*, *Irpex lactus*, *Oudemansiella mucida*, *Phanerochaete gigantea*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus obtusus*, *Saxidomus giganteus*, *Todus multicolor*, *Trametes cinnabarinus* y *Trametes multicolor*. Algunas enzimas piranosas oxidadas identificadas de estas especies se exponen en la Tabla D, a continuación. Las proteínas enumeradas en la tabla a continuación son ejemplos de piranosas oxidadas que se conocen en la técnica, o se identifican en el presente documento como que son una piranosas oxidadas.

60

65

Tabla D. Secuencias de Piranosa Oxidasa

Base de datos	Número de acceso	Organismo	Referencia
Swiss Prot	Q6UG02	<i>Peniophora gigantea</i>	
Swiss Prot	Q6QWR1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
Swiss Prot	Q7ZA32	<i>Trametes ochracea</i>	
Swiss Prot	Q5G234	<i>Trametes pubescens</i>	
GenPept	Q5B2E9	<i>Emericella nidulans</i>	
GenPept	BAE56707.1 (SEQ ID NO: 10)	<i>Aspergillus oryzae</i>	
GenPept	ACJ54278.1	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	
GenPept	BAC24805.1	<i>Tricholoma matsutake</i>	
GenPept	P59097	<i>Trametes hirsuta</i>	
GenPept	ACM47528.1	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	
GenPept	AAS93628.1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
GenPept	AAO13382.1	<i>Peniophora sp.</i>	
GenPept	BAA11119.1	<i>Trametes versicolor</i>	
GenPept	BAD1079.1	<i>Lyophyllum shimeji</i>	
GenPept	AAW57304.1	<i>Trametes pubescens</i>	
GenPept	AAQ72486.1	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	
		<i>Aspergillus parasiticus</i>	Giffhorn Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 727-740 (2000)
		<i>Auricularia polytricha</i>	Izumi et al., Agric. Biol. Chem., 54: 799-801 (1990)
		<i>Coriolus hirsutus</i>	Machida et al., Agric. Biol. Chem., 48: 2463-2470 (1984)
		<i>Coriolus versicolor</i>	Taguchi et al., J. Appl. Biochem., 7: 289-295 (1985)
		<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Izumi et al., Agric. Biol. Chem., 54: 799-801 (1990)
		<i>Iridophycus faccidum</i>	Giffhorn, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 727-740 (2000)
		<i>Irpex lactus</i>	Izumi et al., Agric. Biol. Chem., 54: 799-801 (1990)
		<i>Oudemansiella mucida</i>	Giffhorn, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 727-740 (2000)
		<i>Phanerochaete gigantean</i>	Giffhorn, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 727-740 (2000)
		<i>Pleurotus ostreatus</i>	Giffhorn, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 727-740 (2000)
		<i>Polyporus obtusus</i>	Janssen et al., Methods Enzymol., 41B: 170-173 (1975)
		<i>Saxidomus giganteus</i>	Giffhorn, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 727-740 (2000)
		<i>Todus multicolor</i>	Giffhorn, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 727-740 (2000)
		<i>Trametes cinnabarinus</i>	Izumi et al., Biol. Chem., 54: 799-801 (1990)
		<i>Trametes multicolor</i>	Tasca et al., Electroanal., 19: 294-302 (2007)

Algunas secuencias de aminoácidos que codifican piranosa oxidasa se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica *Aspergillus oryzae* PO1 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 9, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Aspergillus oryzae* PO1 se expone como SEQ ID NO: 10.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosa oxidasa es piranosa oxidasa (E.C. 1.1.3.10). En algunas realizaciones, la piranosa oxidasa es una piranosa oxidasa con la secuencia de aminoácidos de *Aspergillus oryzae* PO1 como se expone en SEQ ID NO: 10. En otras realizaciones, la piranosa oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla D. En algunas realizaciones, la piranosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la piranosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla D. En algunas realizaciones, la piranosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente con SEQ ID NO: 9 bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas, como se describe anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, la piranosa oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla D.

45 En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosa oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla D. Similitud como se usa en el presente documento se describe en mayor detalle anteriormente en este documento.

Las secuencias de piranosa oxidasa pueden identificarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un alineamiento de secuencias contra una base de datos, por ejemplo, contra la base de datos NCBI, y pueden seleccionarse secuencias con el menor valor E de HMM.

65 **Gluco-oligosacárido oxidasa.** Como se indica en el presente documento, las gluco-oligosacárido oxidasas y

células fúngicas modificadas por tener actividad de GOOX reducida encuentran uso en la presente divulgación. La actividad de gluco-oligosacárido oxidasa puede medirse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de actividad de GOOX como se describe por Lin et al., (Biochim. Biophys. Acta. 1991, 11:417-427), o Lee et al. (Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71:8881-8887), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Por ejemplo, la actividad puede medirse determinando la producción de H₂O₂ acoplado a un ensayo de enzima peroxidasa.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células fúngicas proporcionadas en el presente documento que han sido genéticamente modificadas para reducir la actividad secretada de al menos una gluco-oligosacárido oxidasa tienen actividad secretada reducida de una gluco-oligosacárido oxidasa endógena. Por consiguiente, una o más enzimas gluco-oligosacárido oxidasa de cada una de las especies fúngicas descritas en el presente documento puede ser elegida como diana para la modificación genética.

En algunas realizaciones de la divulgación, la gluco-oligosacárido oxidasa es de una especie fúngica en la división basidiomiceto y que pertenece a la clase Agaricomycetes; o en la división ascomiceto y que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. Algunos ejemplos de gluco-oligosacárido oxidasa identificada de la división basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes; y la división ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina se exponen en la tabla más adelante.

En algunas realizaciones de la divulgación, la gluco-oligosacárido oxidasa es de una especie fúngica seleccionada de *Acremonium strictum* y *Paraconiothyrium sp.* Algunas enzimas gluco-oligosacárido oxidasa identificadas de estas especies se exponen en la Tabla E, a continuación. Las proteínas enumeradas en la tabla a continuación son ejemplos de gluco-oligosacárido oxidasa que se conocen en la técnica, o se identifican en el presente documento como que son una gluco-oligosacárido oxidasa.

Tabla E. Secuencias de Glucooligosacarida Oxidasa			
Base de datos	Número de acceso	Organismo	Referencia
TrEMBL UniProt	Q6PW77 (SEQ ID NO: 12)	<i>Acremonium strictum</i>	
		<i>Paraconiothyrium sp.</i>	Kiryu et al., 2008, Biosci. Biotechnol. Biochem., 72: 833-841 (2008)

Algunas secuencias de aminoácidos que codifican gluco-oligosacárido oxidasa se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica *Acremonium strictum* GOOX1 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 11, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Acremonium strictum* GOOX1 se expone como SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones de la divulgación, la gluco-oligosacárido oxidasa es gluco-oligosacárido oxidasa (E.C. 1.1.99.B3). En algunas realizaciones, la gluco-oligosacárido oxidasa es una gluco-oligosacárido oxidasa con la secuencia de aminoácidos de *Acremonium strictum* GOOX1 como se exponen en SEQ ID NO: 12. En otras realizaciones, la gluco-oligosacárido oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla E. En algunas realizaciones, la gluco-oligosacárido oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, la gluco-oligosacárido oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 11.

aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla E. En algunas realizaciones, la gluco-oligosacárido oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente con SEQ ID NO: 11 bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas, como se describe anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, la gluco-oligosacárido oxidasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla E.

En algunas realizaciones de la divulgación, la gluco-oligosacárido oxidasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla E. Similitud como se usa en el presente documento se describe en mayor detalle anteriormente en este documento.

Las secuencias de gluco-oligosacárido oxidasa pueden identificarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un alineamiento de secuencias contra una base de datos, por ejemplo, contra la base de datos NCBI, y pueden seleccionarse secuencias con el menor valor E de HMM.

Piranosas deshidrogenasas. En algunas realizaciones de la divulgación, piranosas deshidrogenasas y células fúngicas que tienen actividad de piranosas deshidrogenasa reducida encuentran uso en la presente divulgación. La actividad de piranosas deshidrogenasa puede medirse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de actividad de PDH usando cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, Volc et al., Arch. Microbiol., 176:178-186 [2001]).

En algunas realizaciones de la divulgación, las células fúngicas que han sido genéticamente modificadas para reducir la actividad secretada de una piranosas deshidrogenasa tienen actividad secretada reducida de una piranosas deshidrogenasa endógena. Por consiguiente, una o más enzimas piranosas deshidrogenasa de cada una de las especies fúngicas descritas en el presente documento puede ser elegida como diana para la modificación genética.

En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosas deshidrogenasa es de una especie fúngica en la división basidiomiceto y que pertenece a la clase Agaricomycetes; o en la división ascomiceto y que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. Algunos ejemplos de piranosas deshidrogenasa identificadas de la división basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes; y división ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina se exponen en la tabla a continuación.

En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosas deshidrogenasa es de una especie fúngica seleccionada de *Agaricus bisporus*, *Agaricus meleagris*, *Agaricus xanthoderma*, *Macrolepiota rhacodes* y *Leucoagaricus meleagris*. Algunas enzimas piranosas deshidrogenasa identificadas de estas especies se exponen en tabla F, más adelante. Las proteínas enumeradas en la tabla a continuación son ejemplos de piranosas deshidrogenasa que se conocen en la técnica, o se identifican en el presente documento como que son una piranosas deshidrogenasa.

Tabla F. Secuencias de Piranosa Oxidasa			
Base de datos	Número de acceso	Organismo	Referencia
TrEMBL UniProt	Q3L1D1 (SEQ ID NO:14)	<i>Agaricus bisporus</i>	
TrEMBL UniProt	Q3L245	<i>Agaricus meleagris</i>	
TrEMBL UniProt	Q0R4L2	<i>Agaricus meleagris</i>	
TrEMBL UniProt	Q3L243	<i>Agaricus meleagris</i>	
TrEMBL UniProt	Q3L1D2	<i>Agaricus xanthoderma</i>	
		<i>Macrolepiota rhacodes</i>	Volc et al., Arch. Microbiol., 176:178-186 (2001)
GenBank	AAW82996.1	<i>Leucoagaricus meleagris</i>	
GenBank	AAW82998.1	<i>Leucoagaricus meleagris</i>	
GenBank	AAZ94874.1	<i>Leucoagaricus meleagris</i>	

Algunas secuencias de aminoácidos que codifican piranosa deshidrogenasa se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica *Agaricus bisporus* PDH1 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 13, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Agaricus bisporus* PDH1 se expone como SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosa deshidrogenasa es piranosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.99.29). En algunas realizaciones, la piranosa deshidrogenasa es una piranosa deshidrogenasa con la secuencia de aminoácidos de *Agaricus bisporus* PDH1 como se expone en SEQ ID NO: 14. En algunas otras realizaciones, la piranosa deshidrogenasa comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla F. En algunas realizaciones, la piranosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la piranosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla F. En algunas realizaciones, la piranosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente con SEQ ID NO: 13 bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas, como se describe anteriormente en este documento. En algunas

realizaciones, la piranosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla F.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, la piranosa deshidrogenasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla F. Similitud como se usa en el presente documento se describe en mayor detalle anteriormente en este documento.

Las secuencias de piranosa deshidrogenasa pueden identificarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un alineamiento de secuencias contra una base de datos, por ejemplo, contra la base de datos NCBI, y pueden seleccionarse secuencias con el menor valor E de HMM.

Glucosa deshidrogenasa. Como se indica en el presente documento, glucosa deshidrogenasas y células fúngicas que han sido modificadas para tener actividad de glucosa deshidrogenasa reducida encuentran uso en la presente divulgación. La actividad de glucosa deshidrogenasa puede medirse usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Strecker, Meth. Enzymol., 1:335 [1955]). En algunas realizaciones, la actividad de GDH se determina por un aumento en la absorbancia a 340 nm resultante de la generación de NADH a partir de NAD cuando la beta-D-glucosa se proporciona como un sustrato y la NAD como un aceptor.

En algunas realizaciones de la divulgación, las células fúngicas proporcionadas en el presente documento que han sido genéticamente modificadas para reducir la actividad secretada de una glucosa deshidrogenasa tienen actividad secretada reducida de una glucosa deshidrogenasa endógena. Por consiguiente, una o más enzimas glucosa deshidrogenasa de cada una de las especies fúngicas descritas en el presente documento puede ser elegida como diana para la modificación genética.

En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa deshidrogenasa es de una especie fúngica en la división basidiomiceto y que pertenece a la clase Agaricomycetes; o en la división ascomiceto y que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina. Algunos ejemplos de glucosa deshidrogenasa identificada de la división basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes; y división ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina se exponen en la tabla a continuación.

En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa deshidrogenasa es de una especie fúngica seleccionada de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* y *Talaromyces stipatus*. Algunas enzimas glucosa deshidrogenasa identificadas de estas especies se exponen en la Tabla G, más adelante. Las proteínas enumeradas en la tabla más adelante son ejemplos de glucosa deshidrogenasa que se conocen en la técnica, o se identifican en el presente documento como que son una glucosa deshidrogenasa.

55

60

65

Tabla G. Secuencias de Glucosa Deshidrogenasa			
Base de datos	Número de acceso	Organismo	Referencia
		<i>Aspergillus niger</i>	Muller, Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr Hyg., 132(a): 14-24 (1977)
		<i>Aspergillus oryzae</i>	Bak, Biochim. Biophys. Acta 139: 277-293 (1967)
		<i>Aspergillus terreus</i>	Tsujimura et al., (2006) Biosci. Biotechnol. Biochem., 70: 654-659 (2006)
GenBank	XP_002482522.1 (SEQ ID NO: 16)	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	
GenBank	XP_002479433.1	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	
GenBank	XP_002481914.1	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	

Algunas secuencias de aminoácidos que codifican glucosa deshidrogenasa se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica *Myceliophthora thermophila* GDH1 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 15, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Myceliophthora thermophila* GDH1 se expone como SEQ ID NO: 16.

En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa deshidrogenasa es glucosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.99.10). En algunas realizaciones, la glucosa deshidrogenasa es una glucosa deshidrogenasa con la secuencia de aminoácidos de *Myceliophthora thermophila* GDH1 como se expone en SEQ ID NO: 16. En algunas otras realizaciones, la glucosa deshidrogenasa comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla G. En algunas realizaciones, la glucosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la glucosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla G. En algunas realizaciones, la glucosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente con SEQ ID NO: 15 bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas, como se describe anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, la glucosa deshidrogenasa está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que puede hibridarse selectivamente bajo condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla G.

En algunas realizaciones de la divulgación, la glucosa deshidrogenasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía y/o entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla G.

aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la referencia de bibliografía o la entrada de GenBank de uno cualquiera de los números de acceso expuestos en la Tabla G. Similitud como se usa en el presente documento se describe en mayor detalle anteriormente en este documento.

Las secuencias de glucosa deshidrogenasa pueden identificarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un alineamiento de secuencias contra una base de datos, por ejemplo, contra la base de datos NCBI, y seleccionarse secuencias con el menor valor E de HMM, según se desee.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena que son secretadas por la célula. En ciertas de tales realizaciones, una primera de las dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16 y una segunda de las dos o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y/o 16.

Mezclas enzimáticas

También se describen en el presente documento mezclas enzimáticas que comprenden al menos una o más enzimas hidrolizantes de celulosa expresadas por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, como se describe anteriormente en este documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla enzimática está en un recipiente que comprende una célula fúngica genéticamente modificada como se describe anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, el recipiente comprende un medio líquido. Por ejemplo, el recipiente puede ser un matraz, reactor de bioproceso y similares. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática está en un volumen líquido. Por ejemplo, el volumen líquido puede ser superior a aproximadamente 0,01 ml, 0,1 ml, 1 ml, 10 ml, 100 ml, 1000 ml, o superior a aproximadamente 10 l, 50 l, 100 l, 200 l, 300 l, 400 l, 500 l, 600 l, 700 l, 800 l, 900 l, 1000 l, 10.000 l, 50.000 l, 100.000 l, 250.000 l y 500.000 l o superior a aproximadamente 1.000.000 l.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es una célula que utiliza lignocelulosa que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y en la que la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que contiene celulosa. En algunas realizaciones, la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que comprende dos o más

enzimas celulasa. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniphora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Humicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es una célula que utiliza lignocelulosa de la familia Chaetomiaceae. En algunas realizaciones, la célula fúngica genéticamente modificada descrita en el presente documento es un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de los géneros *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* o *Chaetomium*. La célula fúngica genéticamente modificada también puede ser un anamorfo o teleomorfo de un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de los géneros *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* o *Chaetomium*. Como tal, la célula fúngica genéticamente modificada también puede seleccionarse de los géneros *Sporotrichum*, *Acremonium* o *Talaromyces*. También se contempla que la célula fúngica genéticamente modificada se seleccione de los géneros *Ctenomyces*, *Thermoascus* y *Scytalidium*, que incluye anamorfos y teleomorfos de células fúngicas de aquellos géneros. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie seleccionada de *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia heterothallica*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia terrestris*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces stipitatus* y *Myceliophthora thermophila*, que incluye anamorfos y teleomorfos de los mismos.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona mezclas enzimáticas que están libres de células. En algunas realizaciones, dos o más celulasas y cualquier enzima adicional y/u otros componentes presentes en las mezclas enzimáticas de celulasa se producen por un único tipo de célula fúngica genéticamente modificada, mientras que en algunas realizaciones las celulasas y/u otras enzimas y/u otros componentes se producen por diferentes microbios. En algunas realizaciones, la fermentaciones comprenden células genéticamente modificadas individuales y/o diferentes microorganismos en combinación, mientras que en algunas otras realizaciones las células se cultivan en fermentaciones separadas. Similarmente, en algunas realizaciones, las dos o más celulasas y/o cualquier enzima adicional y/u otros componentes presentes en la mezcla enzimática de celulasa se expresan individualmente o en sub-grupos de diferentes cepas de diferentes organismos y las enzimas se combinan *in vitro* para producir la mezcla enzimática de celulasa. En algunas realizaciones, las celulasas y/o cualquier enzima adicional y/u otros componentes en la mezcla enzimática se expresan individualmente o en sub-grupos de diferentes cepas de un único organismo, y las enzimas se combinan para preparar la mezcla enzimática de celulasa. En algunas realizaciones, todas las enzimas y/u otros componentes se expresan a partir de un único organismo huésped, tal como la célula fúngica genéticamente modificada como se describe en el presente documento anteriormente.

En algunas realizaciones de la divulgación, las mezclas enzimáticas comprenden al menos una o más enzimas hidrolizantes de celulosa expresadas por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula, como se describe anteriormente en este documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es una célula que utiliza lignocelulosa que es un basidiomiceto que pertenece a la clase Agaricomycetes o un ascomiceto que pertenece a la subdivisión Pezizomycotina, y en la que la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que contiene celulasa. En algunas realizaciones, la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas celulasa. En algunas realizaciones, el basidiomiceto es una especie de *Pleurotus*, *Peniophora*, *Trametes*, *Athelia*, *Sclerotium*, *Termitomyces*, *Flammulina*, *Coniphora*, *Ganoderma*, *Pycnoporus*, *Ceriporiopsis*, *Phanerochaete*, *Gloeophyllum*, *Hericium*, *Heterobasidion*, *Gelatoporia*, *Lepiota* o *Irpex*. En algunas realizaciones, el ascomiceto es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Botryotinia*, *Humicola*, *Neosartorya*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Sclerotinia*, *Chaetomium*, *Nectria*, *Verticillium* o *Aspergillus*.

En algunas realizaciones de la divulgación, la célula fúngica es una célula que utiliza lignocelulosa de la familia Chaetomiaceae. En algunas realizaciones, la célula fúngica genéticamente modificada descrita en el presente documento es un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de los géneros *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* y *Chaetomium*. La célula fúngica genéticamente modificada también puede ser un anamorfo o teleomorfo de un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de los géneros *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* y *Chaetomium*. Como tal, la célula fúngica genéticamente modificada también puede seleccionarse de los géneros *Sporotrichum* o *Acremonium*. También se contempla que la célula fúngica genéticamente modificada también pueda seleccionarse de los géneros *Ctenomyces*, *Scytalidium* y *Thermoascus*, que incluyen anamorfos y teleomorfos de células fúngicas de aquellos géneros. Normalmente, la célula fúngica es una especie seleccionada de *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia heterothallica*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia terrestris*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces stipitatus* y *Myceliophthora thermophila*, que incluyen anamorfos y teleomorfos de las mismas.

Algunas mezclas de celulasa para la eficaz hidrólisis enzimática de celulosa que son conocidas (véanse, por

ejemplo, Viikari et al., Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 108:121-45 [2007]; y publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º US 2009/0061484, US 2008/0057541 y US 2009/0209009) encuentran uso como componentes de algunas mezclas enzimáticas descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, las mezclas de enzimas que existen de forma natural o recombinantes purificadas se combinan con materia prima celulósica o un producto de la hidrólisis de celulosa. Alternativamente o además, una o más poblaciones de células, que produce cada una una o más celulasas que existen de forma natural o recombinantes, se combinan con materia prima celulósica o un producto de la hidrólisis de celulosa. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende celulasas purificadas comercialmente disponibles. Las celulasas comerciales son conocidas y están disponibles para la materia. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas no comprenden una endoglucanasa.

En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla enzimática comprende al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % de GH61. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende además una celobiohidrolasa 1a (por ejemplo, CBH1a) y GH61, en la que las enzimas comprenden juntas al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 % o al menos 80 % de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende además una β -glucosidasa (Bgl), GH61 y CBH, en la que las tres enzimas comprenden juntas al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 % o al menos 85 % de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende además una endoglucanasa (EG), GH61, CBH2b, CBH1a, Bgl, en la que las cinco enzimas comprenden juntas al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 % o al menos 90 % de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática comprende GH61, CBH2b, CBH1, Bgl y al menos una EG, en cualquier proporción adecuada para la reacción deseada.

En algunas realizaciones de la divulgación, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso (en las que el peso total de las celulasas es el 100 %), aproximadamente 20 %-10 % de Bgl, aproximadamente 30 %-25 % de CBH1a, aproximadamente 10 %-30 % de GH61, aproximadamente 20 %-10 % de EG y aproximadamente 20 %-25 % de CBH2b. En algunas realizaciones, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso: aproximadamente 20 %-10 % de GH61, aproximadamente 25 %-15 % de Bgl, aproximadamente 20 %-30 % de CBH1a, aproximadamente 10 %-15 % de EG y aproximadamente 25 %-30 % de CBH2b. En algunas realizaciones, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso: aproximadamente 30 %-20 % de GH61, aproximadamente 15 %-10 % de Bgl, aproximadamente 25 %-10 % de CBH1a, aproximadamente 25 %-10 % de CBH2b, aproximadamente 15 %-10 % de EG. En algunas realizaciones, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso: aproximadamente 40 %-30 % de GH61, aproximadamente 15 %-10 % de Bgl, aproximadamente 20 %-10 % de CBH1a, aproximadamente 20 %-10 % de CBH2b y aproximadamente 15 %-10 % de EG. En algunas realizaciones, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso: aproximadamente 50 %-40 % de GH61, aproximadamente 15 %-10 % de Bgl, aproximadamente 20 %-10 % de CBH1a, aproximadamente 15 %-10 % de CBH2b y aproximadamente 10 %-5 % de EG. En algunas realizaciones, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso: aproximadamente 10 %-15 % de GH61, aproximadamente 20 %-25 % de Bgl, aproximadamente 30 %-20 % de CBH1a, aproximadamente 15 %-5 % de EG y aproximadamente 25 %-35 % de CBH2b. En algunas realizaciones, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso: aproximadamente 15 %-5 % de GH61, aproximadamente 15 %-10 % de Bgl, aproximadamente 45 %-30 % de CBH1a, aproximadamente 25 %-5 % de EG y aproximadamente 40 %-10 % de CBH2b. En algunas realizaciones, la composición de mezcla enzimática comprende celulasas aisladas en las siguientes proporciones en peso: aproximadamente 10 % de GH61, aproximadamente 15 % de Bgl, aproximadamente 40 % de CBH1a, aproximadamente 25 % de EG y aproximadamente 10 % de CBH2b.

En algunas realizaciones de la divulgación, el componente enzimático comprende más de una enzima CBH1a, CBH2b, EG, Bgl y/o GH61 (por ejemplo, 2, 3, 4 o más variantes diferentes), en cualquier combinación adecuada. En algunas realizaciones, una composición de mezcla enzimática de la divulgación comprende además al menos una proteína y/o enzima adicional. En algunas realizaciones, las composiciones de mezcla enzimática de la presente divulgación comprenden además al menos una enzima adicional distinta de GH61, Bgl, CBH1a, GH61 y/o CBH2b. En algunas realizaciones, las composiciones de mezcla enzimática de la divulgación comprenden además al menos una celulasa adicional, distinta de la variante de GH61, Bgl, CBH1a, GH61 y/o CBH2b citada en el presente documento. En algunas realizaciones, el péptido de GH61 de la divulgación también está presente en mezclas con enzimas no celulasa que degradan celulosa, hemicelulosa, pectina y/o lignocelulosa.

En algunas realizaciones de la divulgación, el polipéptido de GH61 de la presente divulgación se usa en combinación con otros componentes opcionales tales como al menos un tampón, tensioactivo y/o agente desengrasante. En algunas realizaciones, se usa al menos un tampón con el polipéptido de GH61 de la presente divulgación (opcionalmente combinado con otras enzimas) para mantener un pH deseado dentro de la disolución en la que se emplea GH61. La concentración exacta de tampón empleado depende de varios factores que el experto puede

determinar. Tampones adecuados son muy conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, al menos un tensioactivo se usa con el GH61 de la presente divulgación. Tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo compatible con GH61 y, opcionalmente, con cualquier otra enzima que se usa en la mezcla. Tensioactivos a modo de ejemplo incluyen un tensioactivo aniónico, no iónico y anfótero. Tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquilbencenosulfonatos lineales y ramificados; alquil o alquenoil éter sulfatos que tienen grupos alquilo o grupos alquenoil lineales o ramificados; sulfatos de alquilo o alquenoil; olefinsulfonatos; alcanosulfonatos, y similares. Contraiones adecuados para los tensioactivos aniónicos incluyen, por ejemplo, iones de metal alcalino, tales como sodio y potasio; iones de metal alcalinotérreo, tales como calcio y magnesio; ión amonio; y alcanolaminas que tienen de 1 a 3 grupos alcohólicos de número de carbono 2 o 3. Tensioactivos anfóteros adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, sulfonatos de sal de amonio cuaternario, tensioactivos anfóteros tipo betaína y similares. Tensioactivos no iónicos adecuados generalmente incluyen polioalquilo éteres, además de alcanolamidas de ácido graso superior o aducto de óxido de alquilo de los mismos, monoésteres de glicerina de ácido graso y similares. Las mezclas de tensioactivos también encuentran uso en la presente invención, como se conoce en la técnica.

En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas de celulasa de la presente divulgación se producen en un proceso de fermentación en el que la célula fúngica descrita en el presente documento anteriormente se cultiva en fermentación en cultivo líquido sumergido. Se pretende que cualquier medio de fermentación y proceso adecuado encuentre uso en la presente invención. En algunas realizaciones, las fermentaciones en líquido sumergido de células fúngicas se realizan como un proceso discontinuo, de lotes alimentados y/o continuo. No se pretende que la presente invención se limite a ningún medio de fermentación, protocolo, proceso y/o equipo particular. En algunas realizaciones, el medio de fermentación es un líquido que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y otros nutrientes, vitaminas y minerales que pueden añadirse a los medios de fermentación para mejorar el crecimiento y la producción de enzimas de la célula huésped. En algunas realizaciones, estos otros componentes del medio se añaden antes de, simultáneamente con o después de la inoculación del cultivo con la célula huésped. En algunas realizaciones, la fuente de carbono comprende un hidrato de carbono que induce la expresión de las enzimas celulasa de la célula fúngica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la fuente de carbono comprende una o más de celulosa, celobiosa, soforosa, xilano, xilosa, xilobiosa y oligo- o poli-sacáridos relacionados conocidos por inducir la expresión de celulasas y beta-glucosidasa en tales células fúngicas. En algunas realizaciones, los medios comprenden celulosa, mientras que en algunas otras realizaciones los medios no comprenden celulosa (es decir, concentraciones medibles de celulosa). En algunas realizaciones adicionales, los medios comprenden fuentes de carbono tales como glucosa, dextrosa, etc. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a ninguna fuente de carbono y/o nitrógeno específica, ya que cualquier fuente de carbono y/o nitrógeno adecuada encuentra uso en la presente invención. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún medio particular, ya que cualquier medio adecuado encontrará uso en el ámbito deseado.

En algunas realizaciones que utilizan fermentación discontinua, la fuente de carbono se añade al medio de fermentación antes de o simultáneamente con la inoculación. En algunas otras realizaciones que utilizan operaciones de lotes alimentados y/o continuas, la fuente de carbono también se suministra continuamente o intermitentemente durante el proceso de fermentación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la fuente de carbono se suministra a una tasa de alimentación de carbono de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2,5 g de carbono/l de cultivo/h, o cualquier cantidad entremedias. En algunas realizaciones adicionales, la fuente de carbono se suministra a una tasa de alimentación de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 g de carbono/l de cultivo/hora o a cualquier tasa adecuada entremedias (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, o aproximadamente 10 g de carbono/l de cultivo/h).

En algunas realizaciones, el proceso de producción de la mezcla enzimática de la presente divulgación se realiza a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 80 °C, o cualquier temperatura entremedias, por ejemplo, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 65 °C, o cualquier temperatura entremedias, o de aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 46 °C, aproximadamente 47 °C, aproximadamente 48 °C, aproximadamente 49 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 51 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 57 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 59 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 61 °C, aproximadamente 62 °C, aproximadamente 63 °C, aproximadamente 64 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 66 °C, aproximadamente 67 °C, aproximadamente 68 °C, aproximadamente 69 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 71 °C, aproximadamente 72 °C, aproximadamente 73 °C, aproximadamente 74 °C, aproximadamente 75 °C,

aproximadamente 76 °C, aproximadamente 77 °C, aproximadamente 78 °C, aproximadamente 79 °C, aproximadamente 80 °C, o cualquier temperatura entremedias.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, los métodos de producción de mezclas enzimáticas de la presente invención se llevan a cabo a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, o cualquier pH entremedias, por ejemplo, de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 6,8, o cualquier pH entremedias, por ejemplo, de aproximadamente pH 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 10 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, 15 aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, o cualquier pH entremedias.

20 En algunas realizaciones, el medio de fermentación que contiene las células fúngicas se usa tras la fermentación, mientras que en algunas otras realizaciones el medio de fermentación que contiene las células fúngicas y la mezcla enzimática se usan, mientras que en algunas realizaciones adicionales, una mezcla enzimática se separa de las células fúngicas (por ejemplo, por filtración y/o centrifugación), y la mezcla enzimática en el medio de fermentación se usa, y en todavía más realizaciones, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezclas enzimáticas se separan del medio de fermentación y luego se usan. Solutos de bajo peso molecular, tales como componentes sin consumir del medio de fermentación, puede eliminarse por ultrafiltración o cualquier otro método adecuado. Cualquier método 25 adecuado para separar células, enzima(s) y/o mezclas enzimáticas encuentran uso en la presente invención. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún método de purificación/separación particular. En algunas realizaciones adicionales, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezclas enzimáticas se concentran (por ejemplo, mediante evaporación, precipitación, sedimentación y/o filtración). En algunas realizaciones se añaden 30 estabilizadores a las composiciones que comprenden células fúngicas, enzima(s) y/o mezclas enzimáticas. En algunas realizaciones, productos químicos tales como glicerol, sacarosa, sorbitol y similares encuentran uso para estabilizar las mezclas enzimáticas. En algunas realizaciones adicionales, otros productos químicos (por ejemplo, benzoato de sodio y/o sorbato de potasio), se añaden a la mezcla enzimática para prevenir el crecimiento de contaminación microbiana. En algunas realizaciones adicionales, componentes adicionales están presentes en las 35 composiciones proporcionadas en el presente documento. No se pretende que la presente invención se limite a ningún producto químico particular y/u otros componentes, ya que diversos componentes encontrarán uso en diferentes ámbitos. De hecho, se contempla que cualquier componente adecuado encuentre uso en las composiciones de la presente invención.

40 Métodos de generación de azúcares fermentables

La presente divulgación proporciona métodos de generación de azúcares fermentables, que incluyen, pero no se limitan a, glucosa. En algunas realizaciones, los métodos de generación de glucosa comprenden poner en contacto 45 celulosa con células fúngicas para producir al menos una enzima, al menos una enzima y/o al menos una mezcla enzimática descrita en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el proceso comprende poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en el que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se produce por una célula fúngica como se describe en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, el método de generación de azúcares fermentables tales como glucosa a partir de celulosa usando la mezcla enzimática es hidrólisis discontinua, hidrólisis de lotes alimentados, hidrólisis continua y/o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la reacción de hidrólisis se agita, mezcla, no se agita, y/o una combinación de las mismas.

55 Los métodos de generación de azúcares fermentables tales como glucosa a partir de celulosa se llevan a cabo a cualquier temperatura adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, o cualquier temperatura entremedias (por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, 60 aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 46 °C, aproximadamente 47 °C, aproximadamente 48 °C, aproximadamente 49 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 51 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 57 °C, 65 aproximadamente 58 °C, aproximadamente 59 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 61 °C, aproximadamente 62 °C, aproximadamente 63 °C, aproximadamente 64 °C, aproximadamente 65 °C,

aproximadamente 66 °C, aproximadamente 67 °C, aproximadamente 68 °C, aproximadamente 69 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 71 °C, aproximadamente 72 °C, aproximadamente 73 °C, aproximadamente 74 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 76 °C, aproximadamente 77 °C, aproximadamente 78 °C, aproximadamente 79 °C, aproximadamente 80 °C, o cualquier temperatura entremedias) encuentra uso.

5
 Además, cualquier pH adecuado encuentra uso en la presente invención. En algunas realizaciones, un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, o cualquier pH entremedias (por ejemplo, aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 6,8, o cualquier pH entremedias, por ejemplo, de aproximadamente pH 3,0, aproximadamente 10 31., aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 15 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 20 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, o cualquier pH entremedias) encuentra uso en la presente invención,

En algunas realizaciones, la concentración inicial de celulosa en el reactor de hidrólisis, antes del inicio de la hidrólisis, es de aproximadamente el 0 % (peso/peso) a aproximadamente el 0,1 % (peso/peso), a aproximadamente 25 el 15 % (peso/peso), o cualquier cantidad entremedias, por ejemplo, aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 % o aproximadamente el 15 % o cualquier cantidad entremedias. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a ninguna 30 temperatura, pH, tiempo, ni concentración de celulosa en la reacción de hidrólisis, particular ya que cualquier temperatura adecuada, pH, tiempo, concentración de celulosa, además de otros parámetros, encuentran uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, la dosificación de la enzima celulasa y/o mezcla enzimática de celulasa usada en la reacción de hidrólisis es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa, o cualquier cantidad adecuada entremedias (por ejemplo, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, 35 aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, 40 aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, 45 aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59, 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, aproximadamente 64, 50 aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67, aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74, aproximadamente 75, aproximadamente 76, aproximadamente 77, aproximadamente 78, aproximadamente 79, aproximadamente 80, aproximadamente 81, aproximadamente 82, aproximadamente 83, aproximadamente 84, aproximadamente 85, aproximadamente 86, aproximadamente 87, aproximadamente 88, aproximadamente 89 %, 55 aproximadamente 90, aproximadamente 91, aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa, o cualquier cantidad entremedias. La hidrólisis se lleva a cabo durante cualquier periodo de tiempo adecuado. En algunas realizaciones, la hidrólisis se realiza de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 300 horas, de aproximadamente 15 horas a 100 horas, o cualquier tiempo entremedias. En algunas realizaciones, la reacción de hidrólisis se realiza durante aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 2, 3, aproximadamente 4, 60 aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, 65 aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115,

aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, aproximadamente 160, aproximadamente 165, aproximadamente 170, aproximadamente 175, aproximadamente 180, aproximadamente 185, aproximadamente 190, aproximadamente 195, aproximadamente 200, aproximadamente 205, aproximadamente 210, aproximadamente 215, aproximadamente 220, aproximadamente 225, aproximadamente 230, aproximadamente 235, aproximadamente 240, aproximadamente 245, aproximadamente 250, aproximadamente 255, aproximadamente 260, aproximadamente 265, aproximadamente 270, aproximadamente 275, aproximadamente 280, aproximadamente 285, aproximadamente 290, aproximadamente 295, aproximadamente 300 horas, o cualquier tiempo entremedias. Debe apreciarse que las condiciones de reacción no pretenden limitar la invención de ninguna manera y pueden ajustarse según se desee por aquellos expertos en la materia. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún tiempo de reacción de hidrólisis particular, concentración de proteína, o cualquier otro parámetro de reacción específico, ya que diversos parámetros de reacción y componentes encuentran uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en un reactor de hidrólisis. En algunas realizaciones, la enzima y/o mezcla enzimática se añade a la materia prima lignocelulósicas pretratada (también denominada el "sustrato") antes, durante o después de la adición del sustrato al reactor de hidrólisis.

En algunas realizaciones, varias condiciones medioambientales se ajustan según cualquier variedad de métodos conocidos en la técnica con el fin de maximizar la formación de un producto de hidrólisis tal como glucosa. Por ejemplo, la temperatura, pH, % de oxígeno disuelto, velocidad de agitación pueden cada uno ajustarse independientemente. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática es una mezcla libre de células, como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones de la divulgación, los métodos de generación de glucosa que utilizan enzimas y/o mezclas enzimáticas que comprenden actividad de glucosa oxidasa reducida y/o celobiosa deshidrogenasa reducida, como se describen en el presente documento, proporcionan mayores rendimientos de glucosa a partir de la celulosa enzimáticamente hidrolizada que un método correspondiente que usa una mezcla enzimática con su complemento completo de actividad de glucosa oxidasa o celobiosa deshidrogenasa. Además, algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento producen disminución de la conversión de los productos de celobiosa y glucosa en el hidrolizado enzimático en productos oxidados tales como gluconolactona, gluconato, ácido gluconico celobionolactona y/o ácido celobiónico.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento que utilizan la(s) célula(s) fúngica(s) genéticamente modificada(s), enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) descritas en el presente documento, el rendimiento de glucosa mejorado se mide y/o cuantifica. Como se describe en el presente documento, el rendimiento de glucosa puede describirse en términos de la cantidad de glucosa generada por rendimiento máximo teórico de glucosa, o en términos de Gmáx.

Por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. N.º 6.090.595 y 7.419.809, el contenido de celulosa puede determinarse por hidrólisis ácida de la celulosa, seguido de determinación de la concentración de glucosa, teniendo en cuenta el agua necesaria para hidrolizar la celulosa. En un ejemplo específico, una suspensión de materia prima se centrifuga, se lava con agua y se suspende en ácido sulfúrico a una concentración de ácido sulfúrico neta del 70 %. La suspensión se incuba a 40 °C durante 30 minutos, seguido de diluir en agua desionizada al 2 % de ácido sulfúrico. En este momento, las muestras se esterilizan en autoclave con vapor a 121 °C durante 1 hora, para convertir los oligómeros en glucosa monomérica. La concentración de glucosa se mide por HPLC o ensayo enzimático como se describe más adelante.

Alternativamente, el contenido de celulosa puede analizarse por espectroscopía infrarroja como se describe en el Ejemplo 1. Por ejemplo, los sólidos pueden lavarse y disponerse sobre el cristal de detección de un espectrómetro de infrarrojos y medirse su absorbancia entre 500-4000 cm^{-1} .

Los niveles de glucosa pueden cuantificarse por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.090.595 y 7.419.809). Por ejemplo, las concentraciones de glucosa pueden determinarse usando un ensayo enzimático acoplado basado en glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano picante (véase, por ejemplo, Trinder, Ann. Clin. Biochem., 6:24-27 [1969]). Métodos adicionales de cuantificación de glucosa incluyen métodos cromatográficos, por ejemplo, por HPLC (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.090.595 y 7.419.809). Los niveles de celobiosa pueden medirse por cualquier número de métodos de HPLC conocidos para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Kotiranta et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 81: 81-90 [1999]).

Similarmente, la disminución de la conversión de productos de celobiosa y glucosa en productos oxidados tales como celobionolactona y gluconolactona puede cuantificarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, los productos de oxidación de glucosa o celobiosa pueden detectarse y cuantificarse usando espectroscopía infrarroja, o por metodologías cromatográficas tales como HPLC (véanse, por ejemplo, Rakotomanga et al., J. Chromatog. B. 4:277-284 [1991]; y Mansfield et al., App. Environ. Microbiol., 64:3804-3809 [1997]). Por

consiguiente, la oxidación total de glucosa o celobiosa puede determinarse, por ejemplo, en función de los productos de oxidación total por el rendimiento máximo teórico de glucosa, o en función de G_{máx}.

5 Los métodos, células fúngicas, enzimas y mezclas enzimáticas descritos en el presente documento incluyen
reducción o eliminación de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de una mezcla enzimática
hidrolizante de celulosa, mejorándose así el rendimiento de azúcares fermentables tales como glucosa, xilosa y/o
celobiosa durante la hidrólisis de celulosa. Ventajosamente, los procesos y mezclas enzimáticas descritas en el
presente documento producen un elevado rendimiento de glucosa y/o celobiosa de la celulosa hidrolizada y una
10 disminución de la oxidación de glucosa y/o celobiosa a productos de azúcar oxidados, tales como gluconolactona,
gluconato, ácido glucónico, celobionolactona y/o ácido celobiónico de la celulosa hidrolizada, con respecto a una
mezcla enzimática con una cantidad sin modificar de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa, o con
respecto a una mezcla enzimática parental.

15 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden poner en contacto un
sustrato de celulosa con células fúngicas que producen al menos una enzima hidrolizante de celulosa, al menos una
enzima hidrolizante de celulosa, y/o una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de
celulosa. En algunas realizaciones, las mezclas enzimáticas se caracterizan porque la oxidación de celobiosa y/o
glucosa se reduce durante hidrólisis de celulosa, como se describe en mayor detalle en el presente documento, con
respecto a una mezcla enzimática con una cantidad sin modificar de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o
20 celobiosa, o con respecto a una mezcla enzimática parental. En algunas realizaciones, los procesos descritos en el
presente documento comprenden proporcionar un sustrato de celulosa, normalmente como una suspensión acuosa,
y proporcionar al menos una mezcla enzimática que comprende al menos dos enzimas hidrolizantes de celulosa, al
menos una enzima hidrolizante de celulosa, y/o células fúngicas que producen al menos una enzima hidrolizante de
celulosa. La suspensión que contiene celulosa se introduce en un recipiente de reacción tal como un reactor de
25 hidrólisis, y la al menos una mezcla enzimática que comprende al menos dos enzimas hidrolizantes de celulosa, al
menos una enzima hidrolizante de celulosa, y/o células fúngicas que producen al menos una enzima hidrolizante de
celulosa, se añade al recipiente, en cualquier orden. Después de un período durante el que se produce la hidrólisis,
se produce el producto de hidrólisis en forma de azúcares fermentables tales como glucosa y/o celobiosa, y, si se
desea, se recupera.

30 En algunas realizaciones, el sustrato celulósico se proporciona en una suspensión acuosa y se añade a un
recipiente de reacción. La concentración de materia prima celulósica en la suspensión depende del material. En
algunas realizaciones, la concentración de materia prima celulósica en la suspensión es entre aproximadamente el
1 % y aproximadamente el 30 % (peso/peso) de sólidos sin disolver, o cualquier concentración entremedias, por
ejemplo, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 %, o de aproximadamente el 10 % a
35 aproximadamente el 20 % de sólidos sin disolver, o cualquier cantidad entremedias. En algunas realizaciones, la
concentración de materia prima celulósica en la suspensión comprende al menos, al menos aproximadamente, hasta
o aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5,
aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10,
40 aproximadamente 11, aproximadamente 12, 13, 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente
17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22,
aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27,
aproximadamente 28, aproximadamente 29 o aproximadamente 30 % de sólidos sin disolver (peso/peso).

45 Cualquier método adecuado conocido en la técnica para generar glucosa a partir de celulosa usando células
fúngicas que producen al menos una enzima hidrolizante de celulosa, al menos una enzima hidrolizante de celulosa
y/o al menos una mezcla enzimática encuentra uso en la presente invención, que incluye, pero no se limita a,
hidrólisis discontinua, hidrólisis de lotes alimentados o hidrólisis continua, además de cualquier combinación
adecuada de los mismos. En algunas realizaciones de procesos discontinuos, todos los materiales necesarios se
50 colocan en un reactor al principio de la operación y el proceso se deja avanzar hasta el fin o hasta un punto final
deseado, momento en el que la reacción de hidrólisis se termina y en algunas realizaciones el producto se recoge.
En cualquier proceso discontinuo, una o más enzimas, las células fúngicas que producen al menos una enzima
hidrolizante de celulosa y/o al menos una mezcla enzimática se añaden al sustrato de celulosa antes, durante o
después de la introducción del sustrato de celulosa al recipiente de reacción. Así, en algunas realizaciones, las
55 células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) se añaden al recipiente de reacción antes introducir sustrato
celulósico al recipiente de reacción. En algunas otras realizaciones, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla(s)
enzimática(s) se añaden al recipiente de reacción simultáneamente con sustrato celulósico. En algunas otras
realizaciones, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) se añaden después de introducir sustrato
celulósico al recipiente de reacción.

60 En algunas realizaciones que utilizan proceso continuo, se suministra sustrato celulósico y el producto de hidrólisis
se elimina periódicamente o continuamente a tasas aproximadamente volumétricamente iguales para mantener la
reacción de hidrólisis a una tasa estacionaria. Pueden realizarse procesos continuos según cualquiera de una
variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, procesos de hidrólisis de flujo
65 ascendente (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 7.727.746). Sin embargo, se apreciará que cualquier otro
proceso continuo adecuado encuentre uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, tras su retirada del reactor, al menos una porción de los sólidos sin convertir se separan del líquido de hidrólisis soluble. La eliminación de los sólidos sin convertir se lleva a cabo usando cualquier método adecuado, que incluye, pero no se limita a, separación de sólidos-líquido (por ejemplo, usando un filtro prensa, filtro de cinta, filtro de tambor, filtro de vacío y/o filtro de membrana), centrifugación, sedimentación (por ejemplo, usando un tanque de sedimentación o un sedimentador inclinado, por ejemplo, como se desvela en Knutsen y Davis, Appl., Biochem. Biotech., 98-100:1161-1172[2002]; y Mores et al., Appl. Biochem. Biotech., 91-93:297-309 [2001]), clarificación, o cualquier otro proceso adecuado como se conocería en la técnica. La clarificación puede llevarse a cabo usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones encuentran uso un clarificador que comprende varias placas inclinadas para facilitar la separación de los sólidos y líquido u otras características que se conocen en la técnica de separación de sólidos-líquido. La glucosa soluble, esencialmente libre de sólidos sin disolver, es entonces adecuada para la fermentación a etanol. Los sólidos sin convertir son principalmente lignina, que puede utilizarse adicionalmente. Por ejemplo, los sólidos sin convertir pueden quemarse y usarse como combustible o convertirse para generar energía eléctrica.

En algunas realizaciones, los sólidos sin convertir comprenden lignina, sílice y/u otros material sólido. No se pretende que la presente invención se limite a ningún sólido sin convertir particular. A medida que la celulosa en la materia prima se hidroliza y se libera de las partículas sólidas, aumenta la proporción de sólidos sin convertir dentro de las partículas sólidas que contienen celulosa. Dependiendo de la densidad y el tamaño de partícula, los sólidos sin convertir pueden eliminarse con los productos en o sedimentar al fondo del recipiente de reacción en un sedimento o lodo. Si se forma una capa de lodo en el fondo del reactor debido a partículas muy pesada, puede emplearse cualquier medio conocido en la técnica para eliminar el lodo o sedimento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa un raspador para eliminar el lodo. En algunas realizaciones alternativas, el fondo del reactor es decreciente para proporcionar una trayectoria en la que sedimentan los sólidos más pesados, y luego se eliminan y se envían para procesamiento, según se desee.

En algunas realizaciones, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) se recuperan y se reutilizan después de completarse la hidrólisis o durante la reacción. La recuperación de las células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) se lleva a cabo usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla enzimática se extraen del líquido de hidrólisis mediante precipitación (por ejemplo, precipitación por pH, precipitación por sal y/o precipitación por temperatura), extracción (por ejemplo, extracción con disolvente) y/o filtración (por ejemplo, ultrafiltración y/o microfiltración). No se pretende que la presente invención se limite a ningún método de recuperación particular ni componente. En algunas realizaciones, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) extraídas se añaden de nuevo a una reacción de hidrólisis. En algunas realizaciones que utilizan ultrafiltración, la membrana tiene un corte de peso molecular (MW) de aproximadamente 1.000, a aproximadamente 20.000. En algunas realizaciones, el corte de MW es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000. En algunas realizaciones, tras la recuperación, las células fúngicas, enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) se recirculan de nuevo a un reactor para la hidrólisis adicional de materia prima adicional. En algunas realizaciones, la(s) enzima(s) recirculada(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) se concentran (por ejemplo, mediante evaporación, precipitación, sedimentación y/o filtración). En algunas realizaciones se añaden productos químicos tales como glicerol, sacarosa, sorbitol y similares para estabilizar la mezcla enzimática. En algunas realizaciones adicionales se añaden otros productos químicos, tales como benzoato de sodio o sorbato de potasio, a la(s) enzima(s) y/o mezcla(s) enzimática(s) para prevenir el crecimiento de contaminación microbiana.

En realizaciones, los métodos se realizan en un volumen de reacción dentro de un recipiente adecuado. Cualquier recipiente adecuado encuentra uso en la presente invención, que incluye, pero no se limita a, matraces, reactores de bioproceso, reactores de hidrólisis y similares. Como se usa en el presente documento, el término "torre de hidrólisis", "reactor de hidrólisis", "reactor de bioproceso", "tanque de hidrólisis" y similares se refieren a un recipiente de reacción de construcción apropiada para acomodar la hidrólisis de suspensión celulósica por al menos una enzima celulasa. Debe apreciarse que pueden utilizarse uno o más reactores de hidrólisis, tal como uno o más reactores con agitación discontinuos o continuos. En algunas realizaciones, en las que se emplea más de un reactor de hidrólisis, los reactores se operan en una serie de dos o más de dos reactores, en cuyo caso la salida de un primer reactor alimenta la entrada de un segundo reactor. Alternativamente, en algunas realizaciones, los reactores operan en paralelo. Además, en algunas realizaciones, algunos de los reactores en la secuencia operan en serie, mientras que otros operan en paralelo. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún recipiente de reactor particular, número de recipientes de reactor, ni ninguna configuración de múltiples reactores.

En algunas realizaciones, el volumen de reacción de la hidrólisis de celulosa es superior a aproximadamente 0,01 ml, aproximadamente 0,1 ml, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 100 ml, aproximadamente 1000 ml, o superior a aproximadamente 5 l, aproximadamente 10 l, aproximadamente 25 l, aproximadamente 50 l, aproximadamente 75 l, aproximadamente 100 l, aproximadamente 150 l, aproximadamente 200 l, aproximadamente 250 l, aproximadamente 300 l, aproximadamente 350 l, aproximadamente 400 l, aproximadamente 450 l, aproximadamente 500 l, aproximadamente 550 l, aproximadamente 600 l, aproximadamente 650 l, aproximadamente 700 l, aproximadamente 750 l, aproximadamente 800 l, aproximadamente 850 l, aproximadamente 900 l, aproximadamente 950 l, aproximadamente 1000 l,

aproximadamente 5000 l, aproximadamente 10.000 l, aproximadamente 50.000 l, aproximadamente 100.000 l, aproximadamente 200.000 l, aproximadamente 250.000 l, aproximadamente 500.000 l, aproximadamente 750.000 l, aproximadamente 1.000.000 l, o superior a aproximadamente 1.000.000 l. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún volumen de reacción particular, ya que cualquier volumen de reacción adecuado/deseado encuentra uso en la presente invención. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción de hidrólisis se agita, no se mezcla, o una combinación ambos. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que la mezcla de reacción de hidrólisis se agita, se usan uno o más impulsores, agitadores, eductores y similares para mezclar la suspensión. En algunas otras realizaciones, la mezcla de reacción de hidrólisis "no se mezcla", en la que no tiene lugar mezcla (es decir, sin agitación) del contenido del reactor durante la reacción de hidrólisis. En algunas realizaciones adicionales, otros factores, tales como el porcentaje de oxígeno disuelto y/o la velocidad de agitación, se monitorizan y se ajustan independientemente según se necesite.

Material celulósico

El material celulósico usado en la presente invención puede ser cualquier material que contenga celulosa. El polisacárido predominante en la pared celular primaria de la biomasa es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa, y el tercero es pectina. La pared celular secundaria, producida después de que la célula haya dejado de crecer, también contiene polisacáridos y se refuerza por lignina polimérica covalentemente reticulada a hemicelulosa. La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y así un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras que las hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos y mananos en estructuras ramificadas complejas con un espectro de sustituyentes. Aunque generalmente es polimorfa, la celulosa se encuentra en tejido de planta principalmente como una matriz cristalina insoluble de cadenas de glucano paralelas. Las hemicelulosas normalmente se unen por hidrógeno a celulosa, además de a otras hemicelulosas, que ayudan a estabilizar la matriz de pared celular.

La celulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, cáscaras, cascarillas y mazorcas de plantas u hojas, ramas y madera de árboles. El material celulósico puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuo agrícola, residuo de silvicultura, residuo sólido municipal, papel usado y residuo de molienda de pulpa y papel (véanse, por ejemplo, Wiselogel et al., en Handbook on Bioethanol, (Wyman, ed.), pág. 105-118, Taylor & Francis, Washington D.C. [1995]; Wyman, Biores. Technol., 50: 3-16 [1994]; Lynd, Appl. Biochem. Biotechnol., 24/25: 695-719 [1990]; Mosier et al., en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, (Scheper, ed.), Vol. 65, pág. 23-40, Springer-Verlag, New York [1999]). Se entiende en el presente documento que la celulosa usada en la presente invención puede estar en forma de lignocelulosa, un material de pared de células de planta que contiene lignina, celulosa y/o hemicelulosa en una matriz mixta. En algunas realizaciones, el material celulósico es lignocelulosa.

En algunas realizaciones, la lignocelulosa pretratada usada en los métodos de la presente invención es un material de origen de planta que, antes del pretratamiento, contiene al menos aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, o aproximadamente el 40 % de celulosa (peso seco). En algunas realizaciones, la lignocelulosa comprende aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 21 %, aproximadamente el 22 %, aproximadamente el 23 %, aproximadamente el 24 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 26 %, aproximadamente el 27 %, aproximadamente el 28 %, aproximadamente el 29 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 31 %, aproximadamente el 32 %, aproximadamente el 33 %, aproximadamente el 34 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 36 %, aproximadamente el 37 %, aproximadamente el 38 %, aproximadamente el 39 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 41 %, aproximadamente el 42 %, aproximadamente el 43 %, aproximadamente el 44 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 46 %, aproximadamente el 47 %, aproximadamente el 48 %, aproximadamente el 49 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 51 %, aproximadamente el 52 %, aproximadamente el 53 %, aproximadamente el 54 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 56 %, aproximadamente el 57 %, aproximadamente el 58 %, aproximadamente el 59 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, de celulosa (peso seco) o cualquier porcentaje entremedias, y al menos aproximadamente el 10 % de lignina (peso seco) a aproximadamente el 12 % (peso seco). Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a material lignocelulósico que comprenda cualquier porcentaje particular de celulosa y/o lignina. En algunas realizaciones, la lignocelulosa se somete a procesos físicos y/o químicos para hacer la fibra más accesible y/o receptiva a las acciones de enzimas celulolíticas. En algunas realizaciones, la materia prima lignocelulósica contiene mayores niveles de celulosa tras el pre-tratamiento, mientras que en otras realizaciones el nivel de celulosa no se altera durante el proceso de pretratamiento. Por ejemplo, si se emplea pretratamiento con ácido, el componente de hemicelulosa se hidroliza, que aumenta el nivel relativo de celulosa. En este caso, en algunas realizaciones, la materia prima pretratada contiene más de aproximadamente el 20 % de celulosa y más de aproximadamente el 12 % de lignina.

Las materias primas lignocelulósicas que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, residuos agrícolas tales como forraje de maíz, paja de trigo, paja de cebada, paja de arroz, paja de avena, paja de canola, paja de caña de azúcar y forraje de soja; residuos de proceso de fibra tales como fibra de maíz, pulpa de remolacha azucarera, finos y desechos del molino de pulpa o bagazo de caña de azúcar; residuos de silvicultura tales como madera de chopo temblón, otras maderas duras, coníferas y serrín; o céspedes tales como césped de pradera, miscanto, pasto y pasto alpiste. En algunas realizaciones, la materia prima lignocelulósica se somete primero a reducción de tamaño por cualquiera de una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, molienda, trituration, agitación, rallado, compresión/expansión, u otros tipos de acción mecánica. La reducción de tamaño por acción mecánica puede realizarse por cualquier tipo de equipo adaptado para el fin, por ejemplo, pero no se limita a, un molino de martillo.

Oxidación de glucosa y celobiosa

Uso de las composiciones y métodos descritos en el presente documento para producir reacciones de hidrólisis que tienen oxidación de celobiosa y/o glucosa reducida durante la hidrólisis de celulosa, con respecto a una mezcla enzimática con una cantidad sin modificar de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa, o con respecto a una mezcla enzimática parental. Por tanto, en algunas realizaciones, la(s) enzima(s) y/o mezclas enzimáticas usadas en el presente documento se caracterizan porque la oxidación de celobiosa y/o glucosa se reduce o elimina.

En algunas realizaciones, en algunos métodos y mezclas enzimáticas de la presente divulgación, la mezcla enzimática se caracteriza porque, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa y/o celulosa y/o glucosa (por ejemplo, un sustrato de celobiosa y/o celulosa y/o glucosa) no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida. Por ejemplo, cuando la mezcla enzimática se pone en contacto con celobiosa o glucosa no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa se oxida para formar celobionolactona, ácido celobiónico, gluconolactona, gluconato o ácido glucónico. Por ejemplo, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de celobiosa y/o glucosa se oxida después de aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, o aproximadamente 60 minutos, o después de aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, aproximadamente 160, aproximadamente 165, aproximadamente 170, aproximadamente 175, aproximadamente 180, aproximadamente 185, aproximadamente 190, aproximadamente 195, aproximadamente 200, aproximadamente 205, aproximadamente 210, aproximadamente 215, aproximadamente 220, aproximadamente 225, aproximadamente 230, aproximadamente 235, aproximadamente 240, aproximadamente 245, aproximadamente 250, aproximadamente 255, aproximadamente 260, aproximadamente 265, aproximadamente 270, aproximadamente 275, aproximadamente 280, aproximadamente 285, aproximadamente 290, aproximadamente 295, o aproximadamente 300 horas o más. En algunas realizaciones de los métodos, la mezcla enzimática se pone en contacto con un sustrato de celulosa y/o glucosa durante un periodo de tiempo fijo en condiciones de reacción en o aproximadamente el óptimo para la actividad enzimática de hidrólisis de celulosa.

En algunas realizaciones en las que la reacción de hidrólisis de celulosa se realiza en modo discontinuo, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celulosa y/o glucosa se oxida.

aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa resultante de la hidrólisis del sustrato de celulosa se oxida después del fin de la reacción de hidrólisis de celulosa en modo discontinuo. En algunas realizaciones en las que la reacción de hidrólisis de celulosa se realiza en modo continuo, no más de aproximadamente el 1 %, aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 13 %, aproximadamente el 14 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 16 %, aproximadamente el 17 %, aproximadamente el 18 %, aproximadamente el 19 % o aproximadamente el 20 % (% en peso) de la celobiosa y/o glucosa resultante de la hidrólisis del sustrato de celulosa se oxida en el momento en el que la reacción de hidrólisis de celulosa alcanza el estado estacionario o estado cuasi-estacionario. En algunas realizaciones, el inicio de la reacción pueden ser las iniciales aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, o 60 minutos, o aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95 o aproximadamente 100 horas, después de que el sustrato de celulosa y las enzimas celulasa se mezclen primero.

La disminución de la conversión de productos de celobiosa y glucosa a productos oxidados tales como celobionolactona y gluconolactona puede cuantificarse por cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, los productos de oxidación de glucosa o celobiosa pueden detectarse y cuantificarse usando espectroscopía infrarroja y/o métodos cromatográficos tales como aquellos que se describen en los ejemplos (véanse también Rakotomanga et al., *J. Chromatog. B.* 4:277-284 [1991]; y Mansfield et al., *App. Environ. Microbiol.*, 64:3804-3809 [1997]). Así, en algunas realizaciones, la oxidación total de glucosa y/o celobiosa se determinan, por ejemplo, en función de los productos de oxidación total por el rendimiento máximo teórico de glucosa, o en función de G_{\max} , como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la evaluación de la actividad oxidante de glucosa y/o celobiosa en una mezcla enzimática se lleva a cabo bajo condiciones similares de pH y temperatura a aquellas empleadas para el proceso de hidrolizar celulosa como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la evaluación de la actividad oxidante de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, o a un pH de aproximadamente 5,0 a 6,0; y a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, o a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. La concentración de glucosa y/o celobiosa en la evaluación normalmente está en un intervalo de concentraciones de glucosa y/o celobiosa que se esperaría que se generara durante el proceso de hidrolizar celulosa como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las concentraciones de glucosa y/o celobiosa son de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 500 g/l, o de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 200 g/l, o de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 100 g/l. En algunas realizaciones, una mezcla enzimática se mezcla con una disolución que contiene tanto aproximadamente el 50 % peso/peso de glucosa y aproximadamente el 5 % peso/peso de celobiosa como una disolución que contiene aproximadamente el 50 % peso/peso de glucosa sola, a aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 24 h, como se expone en los ejemplos, después de que se cuantificaran los productos de oxidación de glucosa y/o celobiosa, por ejemplo, por IR o por HPLC como se describe en los ejemplos. En algunas realizaciones, una mezcla enzimática se mezcla con una disolución que contiene aproximadamente 100 g/l de glucosa a aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente 55 °C durante aproximadamente 24 h.

Adicionalmente, cuando se compara la actividad oxidante de glucosa y/o celobiosa en una mezcla enzimática con una mezcla enzimática de referencia (por ejemplo, parental), las condiciones de pH, temperatura y concentración de glucosa/celobiosa dependerán de propiedades tales como el pH y los óptimos de temperatura y estabilidad, además de la afinidad del sustrato, de las enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa particulares que están presentes en la mezcla de referencia y se eliminan o inactivan en la mezcla enzimática de interés. En algunas realizaciones, la comparación se lleva a cabo a un intervalo de pH y de temperatura que es óptimo para la mezcla enzimática de referencia. En algunas otras realizaciones, la comparación se lleva a cabo a aproximadamente pH y dentro del intervalo de temperatura que es óptimo para la reacción de hidrólisis de celulosa de la mezcla enzimática modificada. En algunas realizaciones, la evaluación de la actividad oxidante de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, o a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, o aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C. Además, se apreciará que la concentración de sustrato de celobiosa y/o glucosa en una comparación tal generalmente estará dentro de un intervalo de manera que se detecten fácilmente productos de oxidación del sustrato de celobiosa y/o glucosa usando la mezcla enzimática de

referencia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración de sustrato de celobiosa y/o glucosa está por debajo de una concentración que produciría la inhibición del sustrato de las enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa en la mezcla enzimática de referencia. Así, en algunas realizaciones, las concentraciones de glucosa y/o celobiosa generalmente oscilan de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 300 g/l, o de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 100 g/l, o de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 70 g/l. En algunas realizaciones se lleva a cabo un análisis de actividad oxidante de glucosa y/o celobiosa en una mezcla enzimática bajo condiciones similares, que incluyen, pH, temperatura y concentraciones de glucosa y/o celobiosa, a aquellas empleadas para el proceso de hidrolizar celulosa. Además, se apreciará que deben usarse condiciones idénticas para analizar la actividad oxidante de glucosa y/o celobiosa de tanto una mezcla enzimática modificada como una mezcla enzimática de referencia.

En algunas realizaciones, la conversión de productos de celobiosa y glucosa a productos oxidados tales como celobionolactona y gluconolactona se cuantifica indirectamente (por ejemplo, midiendo la cantidad total de glucosa y celobiosa producida con respecto a la cantidad de celulosa consumida). En algunas reacciones de hidrólisis de celulosa, los únicos subproductos significativos de la reacción de degradación de celulosa son productos oxidados de celobiosa o glucosa, o productos de transglucosilación. La presencia de productos de transglucosilación puede distinguirse de la presencia de productos oxidados de celobiosa o glucosa usando una variedad de métodos conocidos en la técnica o de otro modo proporcionados en los ejemplos en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, solo productos de transglucosilación, pero no productos oxidados, son hidrolizados por ácido para formar solo glucosa. Así, en algunas realizaciones, se determina la diferencia entre la cantidad de celulosa consumida y la cantidad de celobiosa y/o glucosa presente, y refleja la cantidad de productos oxidados de celobiosa o glucosa, o refleja la cantidad de productos oxidados de celobiosa o glucosa y la cantidad de productos de transglucosilación. Los métodos de cuantificación de celulosa y glucosa se conocen en la técnica o se proporcionan de otro modo en cualquier parte en el presente documento.

Conversión de celulosa a celobiosa y/o glucosa

En algunas realizaciones, los métodos de generación de glucosa, como se describen en el presente documento, usando la mezcla enzimática con actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa reducida o eliminada, y la propia mezcla enzimática, se caracterizan por proporcionar un mayor rendimiento de celobiosa y/o glucosa a partir de la celulosa enzimáticamente hidrolizada que un proceso correspondiente usando una mezcla enzimática, o una propia mezcla enzimática, con una cantidad sin modificar de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, los métodos de generación de glucosa proporcionados en el presente documento que usan la mezcla enzimática con actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa reducida o eliminada, y la propia mezcla enzimática, se caracterizan por proporcionar un mayor rendimiento de celobiosa y/o glucosa a partir de la celulosa enzimáticamente hidrolizada que un proceso correspondiente usando una mezcla enzimática de referencia bajo esencialmente el mismo pH, temperatura y otras condiciones que incluyen, pero no se limitan a, concentración de materia prima, concentración de mineral, tasa de agitación, porcentaje de oxigenación, y otras condiciones relevantes para aquellos expertos en la materia para reproducir la hidrólisis de reacciones de celulosa.

En referencia a una "cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa sin modificar", esta expresión se refiere a una mezcla enzimática obtenida de un organismo de fuente biológica en el que el organismo de fuente biológica no se ha modificado genéticamente o modificado de otro modo de tal forma que se dirija específicamente y así reduzca la secreción, expresión o actividad de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, y/o la mezcla enzimática no se ha manipulado de tal forma que así reduzca la cantidad o actividad de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa. En referencia a una mezcla enzimática de referencia, este término se refiere a una mezcla enzimática obtenida de un organismo de fuente biológica de referencia que es el mismo organismo de fuente biológica que el organismo de fuente biológica que proporciona la mezcla enzimática con actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa reducida o eliminada, en el que el organismo de fuente biológica no se ha modificado genéticamente de tal forma que se dirija específicamente y así reduzca la secreción, expresión o actividad de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, y la mezcla enzimática no se ha manipulado de tal forma que así se reduzca la cantidad o actividad de una enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa.

Como se usa en el presente documento en referencia a un porcentaje de celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática presente en forma de celobiosa y/o glucosa, estos porcentajes reflejan un porcentaje en peso basado en el peso seco de la celulosa hidrolizada.

Así, en algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, cuando las células fúngicas que producen al menos una enzima, al menos una enzima y/o al menos una mezcla enzimática se pone en contacto con celulosa, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % (% en peso) de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática está presente en forma de celobiosa y/o glucosa. En algunas realizaciones, las células fúngicas que

5 producen al menos una enzima, al menos una enzima y/o al menos una mezcla enzimática se pone en contacto con
 celulosa durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 1, aproximadamente 5 aproximadamente 10,
 aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35,
 aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, o aproximadamente 60
 10 minutos, o al menos aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4,
 aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9,
 aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14,
 aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19,
 aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40,
 15 aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65,
 aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90,
 aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115,
 aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente
 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, aproximadamente 160,
 aproximadamente 165, aproximadamente 170, aproximadamente 175, aproximadamente 180, aproximadamente
 185, aproximadamente 190, aproximadamente 195, aproximadamente 200, aproximadamente 205,
 aproximadamente 210, aproximadamente 215, aproximadamente 220, aproximadamente 225, aproximadamente
 230, aproximadamente 235, aproximadamente 240, aproximadamente 245, aproximadamente 250,
 20 aproximadamente 255, aproximadamente 260, aproximadamente 265, aproximadamente 270, aproximadamente
 275, aproximadamente 280, aproximadamente 285, aproximadamente 290, aproximadamente 295, o
 aproximadamente 300 horas o más.

25 En algunas realizaciones en las que la reacción de hidrólisis de celulosa se realiza en modo discontinuo, al menos
 aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %,
 aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %,
 aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %,
 aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %,
 aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, 9 aproximadamente 8 %, aproximadamente el 99 % o
 30 aproximadamente el 100 % (% en peso) de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática está presente en forma
 de celobiosa y/o glucosa después del fin de la reacción de hidrólisis de celulosa en modo discontinuo. En algunas
 realizaciones en las que la reacción de hidrólisis de celulosa se realiza en modo continuo, al menos
 aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %,
 aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %,
 aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %,
 35 aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %,
 aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o
 aproximadamente el 100 % (% en peso) de la celulosa hidrolizada por la mezcla enzimática está presente en forma
 de celobiosa y/o glucosa en el momento en el que la reacción de hidrólisis de celulosa alcanza el estado estacionario
 o estado cuasi estacionario. En algunas realizaciones, el inicio de la reacción pueden ser las iniciales
 40 aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20,
 aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45,
 aproximadamente 50, aproximadamente 55, o aproximadamente 60 minutos, o aproximadamente 1,5,
 aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6,
 aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 12,
 45 aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17,
 aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30,
 aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55,
 aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80,
 50 aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, o aproximadamente 100 horas, después de que
 el sustrato de celulosa y las enzimas celulasa se mezclen primero.

Mezclas enzimáticas con actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa reducida

55 La presente divulgación proporciona mezclas enzimáticas con actividad enzimática oxidante de glucosa y/o
 celobiosa reducida que, cuando se ponen en contacto con celulosa, producen un mayor rendimiento de glucosa de
 la hidrólisis de celulosa que un método correspondiente que usa una mezcla enzimática con una cantidad sin
 modificar de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática
 se caracteriza por proporcionar un mayor rendimiento de celobiosa y/o glucosa a partir de la celulosa
 60 enzimáticamente hidrolizada que un proceso correspondiente usando una mezcla enzimática de referencia. En
 algunas realizaciones, la mezcla enzimática se caracteriza por causar una conversión reducida de los productos de
 celobiosa y glucosa en el hidrolizado enzimático a productos oxidados tales como celobionolactona y gluconolactona
 con respecto a una mezcla enzimática con una cantidad sin modificar de actividad enzimática oxidante de glucosa
 y/o celobiosa, o con respecto a una mezcla enzimática de referencia.

65 En algunas realizaciones, una mezcla enzimática con actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa
 reducida se trata para reducir la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa en la mezcla enzimática. Se

apreciará fácilmente que cualquiera de una variedad de tecnologías conocidas en la técnica puede emplearse para reducir la cantidad de enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática, que incluyen, pero no se limitan a, procesos de purificación que eliminan selectivamente una o más actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones se añaden inhibidores de la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa a la mezcla enzimática. Realizaciones adicionales incluyen el uso de células fúngicas genéticamente modificadas para reducir la cantidad de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena secretadas por la célula fúngica.

Procesos de purificación. En algunas realizaciones, la mezcla enzimática se somete a un proceso de purificación para separar selectivamente una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática. En algunas realizaciones, el proceso de purificación comprende eliminar la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática usando una fase estacionaria basada en afinidad. Las tecnologías de purificación basadas en afinidad son muy conocidas en la técnica, e incluyen cualquier método para unir selectivamente un componente de una mezcla biológica a un soporte sólido basándose en una interacción biológica altamente específica tal como aquella entre el antígeno y el anticuerpo o la enzima y el sustrato. Así, las metodologías basadas en afinidad incluyen poner en contacto la mezcla enzimática con perlas o cualquier otro soporte sólido adecuado que comprenda anticuerpos u otras moléculas que se unen selectivamente a e inmovilizan la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, mientras que los restantes componentes de la mezcla enzimática siguen en la disolución. Algunos ejemplos incluyen métodos de cromatografía tanto en forma de lote como en forma de columna. El soporte sólido puede comprender partículas individuales (por ejemplo, perlas de resina para cromatografía) o soportes contiguos (por ejemplo, matrices). Entonces pueden emplearse ligandos inmovilizados sobre una matriz de soporte sólido para purificar dianas de disoluciones complejas. Soportes de cromatografía convencionales, además de métodos convencionales para injertar anticuerpos, son muy conocidos en la técnica y se describen en numerosos libros de texto estándar. Estos métodos incluyen el uso de tubos, partículas tales como perlas y cualquier otro soporte sólido adecuado. Por ejemplo, están disponibles partículas en una variedad muy grande de materiales diferentes, que incluyen sílice, vidrio, celulosa, agarosa, y una amplia variedad de polímeros diferentes, que incluyen poliestireno, poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), agarosa, hidrogel, resinas acrílicas y otros tipos de geles usados para electroforesis. Estos soportes pueden comprarse con ligandos previamente unidos o, alternativamente, los ligandos pueden unirse indirectamente o inmovilizarse directamente sobre el soporte usando métodos convencionales muy conocidos para aquellos expertos en la materia (véanse, por ejemplo, Biancala et al., *Lett. Peptide Sci.*, 7:297[2000]; MacBeath et al., *Science*, 289:1760-1763 [2000]; Cass et al., (eds.), *Proc. Thirteenth Am. Peptide Symp.*, Leiden, Escom, 975-979 [1994]; patente de EE.UU. N.º 5.576.220; Cook et al, *Tetrahed. Lett.*, 35:6777-6780 [1994]).

En algunas realizaciones, la fase estacionaria comprende anticuerpos y/o cualquier otra molécula que se une selectivamente a la enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa, tal como un fragmento de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab' o F(ab')₂). Estrategias para el agotamiento de proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas son muy conocidas (véase, por ejemplo, Bjorhall et al. *Proteomics* 5:307-317 [2005]). En algunas realizaciones, la fase estacionaria comprende anticuerpos dirigidos hacia glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18), piranosa oxidasa (EC1.1.3.10), gluco-oligosacárido oxidasa (EC 1.1.99.B3), piranosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.29) o glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.10).

En algunas realizaciones, la fase estacionaria comprende moléculas que se unen selectivamente a la(s) enzima(s) oxidante(s) de glucosa y/o celobiosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una proteína de unión, sustrato, análogo de sustrato u otra molécula pequeña se acopla a la fase estacionaria para unir selectivamente la enzima de interés. En algunas realizaciones, la fase estacionaria comprende una glucosa y/o celobiosa ligada a la fase estacionaria. En algunas otras realizaciones, la fase estacionaria comprende un dinucleótido de flavina-adenina (FAD) ligado a la fase estacionaria.

Se apreciará que cualquiera de una variedad de otras metodologías de purificación son útiles en la eliminación selectiva de una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la metodología de purificación comprende métodos de fraccionamiento que incluyen precipitación selectiva tal como precipitación con sulfato de amonio, precipitación isoeléctrica, desnaturalización térmica selectiva, o cualquier otro método que precipite selectivamente enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática, mientras que deje otros componentes de la mezcla enzimática en disolución, o viceversa.

En algunas otras realizaciones, las metodologías de purificación comprenden métodos cromatográficos que incluyen filtración en gel, exclusión por tamaño, intercambio aniónico, intercambio catiónico, electroforesis en gel y/u otro método de separación cromática conocido en la técnica para separar físicamente proteínas.

Inhibidores de oxidasa. En algunas realizaciones de la divulgación, la reducción de la cantidad de actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa de la mezcla enzimática emplea la adición de uno o más inhibidor(es) de enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa a la mezcla enzimática. Los inhibidores de enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa oscilan de inhibidores de oxidasa de amplio espectro a inhibidores específicos de enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa, como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, un inhibidor de oxidasa de amplio espectro se añade a la mezcla enzimática. Los inhibidores de oxidasa de amplio espectro son muy conocidos en la técnica. Algunos ejemplos incluyen, pero no se

limitan a, cloruro mercúrico, sulfato de plata, compuestos de hidracina tales como aminoguanidina, semicarbazida, benserazida, dihidrazida oxálica, hidralazina, fenilhidracina, carbidopa, diaminoguanidina, y quelantes de cobre tales como desferrioxamina, EDTA, azida de sodio, cianuro de potasio, trieno 5, o-fenantrolina, histidina y varios aniones metálicos tales como Ag^+ , Hg^{2+} y Zn^{2+} .

En algunas realizaciones, un inhibidor específico de enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa se añade a la mezcla enzimática. Inhibidores específicos de celobiosa deshidrogenasa incluyen, pero no se limitan a, análogos de sustrato y otros inhibidores específicos tales como celobioimidazol, gentiobiosa, lactobiono-1,5-lactona, celiobono-1,5-lactona, tri-N-acetilquitotriosa, metil-beta-D-celobiosidasa, 2,2-bipiridina y/o citocromo C. Inhibidores específicos de glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, gluco-oligosacárido oxidasa, piranosa deshidrogenasa y glucosa deshidrogenasa incluyen, pero no se limitan a, análogos de sustrato y otros inhibidores específicos.

Células fúngicas genéticamente modificadas. En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla enzimática se produce por una célula fúngica que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de la actividad enzimática oxidante de glucosa y/o celobiosa endógena que es secretada por la célula fúngica.

Modificaciones genéticas contempladas en el presente documento para reducir la actividad enzimática de enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa producidas por una célula fúngica. Cualquier enzima oxidante de glucosa y/o celobiosa conocida en la técnica puede ser elegida como diana para la reducción de la actividad por modificación genética. Por ejemplo, enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa incluyen glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18), piranosa oxidasa (EC 1.1.3.10), gluco-oligosacárido oxidasa (EC 1.1.99.B3), piranosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.29) y glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.10). Cada una de estas enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa se describen en las cuatro solicitudes provisionales a las que la presente solicitud reivindica prioridad (por ejemplo, las solicitudes de patente provisional de EE.UU. N.º de serie 61/409.186, 61/409.217, 61/409.472 y 61/409.480, todas las cuales se presentaron el 2 de noviembre de 2010).

Pretratamiento

En algunas realizaciones, un sustrato de la mezcla enzimática comprende material celulósico pretratado. Así, por ejemplo, en procesos descritos en el presente documento, cualquier proceso de pretratamiento conocido en la técnica puede usarse para alterar los componentes de la pared celular de la planta de material celulósico (véanse, por ejemplo, Chandra et al., Adv. Biochem. Engin./Biotechnol., 108: 67-93 [2007]; Galbe y Zacchi, Adv. Biochem. Engin./Biotechnol., 108: 41-65 [2007]; Hendriks y Zeeman, Biores. Technol., 100:10-18 [2009]; Mosier et al., Biores. Technol., 96: 673-686 [2005]; Taherzadeh y Karimi, Int. J. Mol. Sci., 9:1621-1651 [2008]; y Yang y Wyman, Biofuels Bioprod. Bioref.-Biofpr. 2: 26-40 [2008]).

En algunas realizaciones, el material celulósico se somete a reducción de tamaño de partícula, pre-remojo, humectación, lavado y/o acondicionamiento antes del pretratamiento, usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, pretratamientos convencionales que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, pretratamiento con vapor (con o sin explosión), pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con agua caliente, pretratamiento alcalino, pretratamiento con cal, oxidación en húmedo, explosión en húmedo, expansión de fibra por amoníaco, pretratamiento con amoníaco diluido, pretratamiento con Organosolv y/o pretratamiento biológico. Pretratamientos adicionales incluyen, pero no se limitan a, percolación con amoníaco, ultrasonidos, electroporación, microondas, CO_2 supercrítico, H_2O supercrítica, ozono y pretratamientos por irradiación gamma.

En algunas realizaciones, el material celulósico se pretrata antes de la hidrólisis y/o fermentación. En algunas realizaciones, el pretratamiento se realiza antes de la hidrólisis. En algunas realizaciones alternativas, el pretratamiento se lleva a cabo simultáneamente con la hidrólisis enzimática para liberar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa y/o celobiosa. En algunas realizaciones, la propia etapa de pretratamiento produce alguna conversión de biomasa a azúcares fermentables (incluso en ausencia de enzimas).

Pretratamiento con vapor. En el pretratamiento con vapor, el material celulósico se calienta para romper los componentes de la pared celular de la planta, que incluyen lignina, hemicelulosa y celulosa para hacer la celulosa y otras fracciones (por ejemplo, hemicelulosas) accesibles a las enzimas. El material celulósico se pasa a o a través de un recipiente de reacción en el que el vapor se inyecta para aumentar la temperatura a la temperatura y presión requeridas y se retiene en su interior durante el tiempo de reacción deseado. El pretratamiento con vapor se hace preferentemente a aproximadamente 140 °C a aproximadamente 230 °C, o de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 200 °C, o aproximadamente 170 °C a aproximadamente 190 °C, en el que el intervalo de temperatura óptimo depende de cualquier adición de un catalizador químico. En algunas realizaciones, el tiempo de residencia para el pretratamiento con vapor es de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, o aproximadamente 3 a aproximadamente 12 minutos, o aproximadamente 4 a aproximadamente 10 minutos, en el que el tiempo de residencia óptimo depende del intervalo de temperatura y cualquier adición de un catalizador químico. El pretratamiento con vapor permite cargas de sólidos relativamente altas, de manera que el material

celulósico es generalmente solo niebla durante el pretratamiento. El pretratamiento con vapor se combina frecuentemente con una descarga explosiva del material después del pretratamiento, que se conoce como explosión por vapor, es decir, hacer hervir rápidamente a presión atmosférica y flujo turbulento el material para aumentar el área superficial accesible por fragmentación (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.451.648; Duff y Murray, *Biores. Technol.*, 855: 1-33 [1996]; Galbe y Zacchi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:618-628 [2002]; y publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2002/0164730). Durante el pretratamiento con vapor, los grupos acetilo de la hemicelulosa se escinden y el ácido resultante autocataliza la hidrólisis parcial de la hemicelulosa a monosacáridos y oligosacáridos. La lignina se elimina a solo un grado limitado.

Un catalizador tal como H₂SO₄ o SO₂ (normalmente 0,3 al 3 % peso/peso) se añade frecuentemente antes del pretratamiento con vapor, que disminuye el tiempo y la temperatura, aumenta la recuperación y mejora la hidrólisis enzimática (véanse, por ejemplo, Ballesteros et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 129-132: 496-508 [2006]; Varga et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 113-116:509-523 [2004]; Sassner et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 39:756-762 [2006]).

Pretratamiento químico. Ejemplos de procesos de pretratamiento químico adecuados incluyen, pero no se limitan a, pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con álcali diluido (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2007/0031918 y 2007/0037259), pretratamiento con cal, oxidación en húmedo, explosión por congelación o expansión de fibra con amoníaco (AFEX), percolación con amoníaco (APR) y pretratamientos con Organosolv.

En el pretratamiento con ácido diluido, el material celulósico se mezcla con ácido diluido, normalmente H₂SO₄, y agua para formar una suspensión, se calienta por calor a la temperatura deseada, y después de un tiempo de residencia hierve vigorosamente a presión atmosférica. El pretratamiento con ácido diluido puede realizarse con varios diseños de reactor (por ejemplo, reactores de flujo pistón, reactores en contracorriente, o reactores de lecho de encojimiento en contracorriente continuo; véanse, por ejemplo, Duff y Murray, *Biores. Technol.*, 855: 1-33 [1996]; Schell et al., *Biores. Technol.*, 91:179-188 [2004]; y Lee et al., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 65: 93-115 [1999]).

También encuentra uso cualquier método adecuado para el pretratamiento bajo condiciones alcalinas. Estos pretratamientos alcalinos incluyen, pero no se limitan a, pretratamiento con cal, oxidación en húmedo, percolación de amoníaco (APR), expansión por congelación de fibras con amoníaco (AFEX) y pretratamiento con amoníaco diluido.

El pretratamiento con cal se realiza con carbonato cálcico, hidróxido sódico o amoníaco a temperaturas bajas de 85-150 °C y tiempos de residencia de 1 hora a varios días (véanse, por ejemplo, Wyman et al., *Biores. Technol.*, 96:1959-1966 [2005]; Mosier et al., *Biores. Technol.*, 96:673-686 [2005]; documentos WO 2006/110891; WO 2006/11899; WO 2006/11900; y WO 2006/110901).

La oxidación en húmedo es un pretratamiento térmico realizado normalmente a 180-200 °C durante 5-15 minutos con adición de un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o sobrepresión de oxígeno (véanse, por ejemplo, Schmidt y Thomsen, *Biores. Technol.*, 64:139-151 [1998]; Palonen et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 117:1-17 [2004]; Varga et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 88:567-574 [2004]; Martin et al., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81:1669-1677 [2006]). En algunas realizaciones, el pretratamiento se realiza a aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 40 % de materia seca, o aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 30 % de materia seca, o aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % de materia seca, y frecuentemente el pH se aumenta mediante la adición de álcali tal como carbonato sódico.

Una modificación del método de pretratamiento por oxidación en húmedo, conocido como "explosión en húmedo" (es decir, la combinación de oxidación en húmedo y explosión por vapor), puede tratar materia seca hasta el 30 %. En la explosión en húmedo, el agente de oxidación se introduce durante el pretratamiento después de un cierto tiempo de residencia. El pretratamiento se termina hirviendo vigorosamente a presión atmosférica (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/032282).

La expansión de fibras con amoníaco (AFEX) implica tratar material celulósico con amoníaco líquido o gaseoso a temperaturas moderadas tales como 90-100 °C y alta presión tal como 17-20 bar durante 5-10 minutos, en la que el contenido de materia seca puede ser de hasta el 60 % (véanse, por ejemplo, Gollapalli et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98:23-35 [2002]; Chundawat et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 96:219-231 [2007]; Alizadeh et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 121:1133-1141 [2005]; Teymouri et al., *Biores. Technol.*, 96:2014-2018 [2005]). El pretratamiento AFEX produce la despolimerización de celulosa y la hidrólisis parcial de hemicelulosa. Se escinden complejos de lignina-hidrato de carbono. El pretratamiento con amoníaco diluido utiliza disoluciones más diluidas de amoníaco que AFEX y puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 100-150 °C, o cualquier temperatura entremedias (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2007/0031918 y 2007/0037259). La duración del pretratamiento con amoníaco diluido puede ser 1-20 minutos, o cualquier duración entremedias.

El pretratamiento con Organosolv designifica material celulósico por extracción usando etanol acuoso (40-60 % de etanol) a 160-200 °C durante 30-60 minutos (véanse, por ejemplo, Pan et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 90:473-481

[2005]; Pan et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94:851-861 [2006]; y Kurabi et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 121:219-230 [2005]). El ácido sulfúrico se añade normalmente como catalizador. En el pretratamiento con Organosolv la mayoría de la hemicelulosa se elimina.

- 5 Hay diversos otros métodos adecuados para el pretratamiento que encuentran uso en la presente invención (véanse, por ejemplo, Schell et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 105-108:69-85 [2003]; y Mosier et al., *Biores. Technol.*, 96:673-686 [2005]; y publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2002/0164730).

10 En algunas realizaciones, el pretratamiento químico se lleva a cabo como un tratamiento ácido. En algunas realizaciones alternativas, es un tratamiento con ácido diluido y/o débil continuo. En algunas realizaciones, el ácido es ácido sulfúrico, pero también encuentran uso otros ácidos, que incluyen, pero no se limitan a, ácido nítrico, ácido fosfórico, cloruro de hidrógeno, y/o mezclas de los mismos. El tratamiento con ácido débil se realiza en el intervalo de pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, o aproximadamente 1 a aproximadamente 4, o aproximadamente 1 a aproximadamente 3. En algunas realizaciones, la concentración de ácido está en el intervalo de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20 % en peso de ácido, o aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 10 % en peso de ácido, o aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 5 % en peso de ácido, o aproximadamente el 0,2 a aproximadamente el 2,0 % en peso de ácido. El ácido se pone en contacto con material celulósico y se mantiene a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 160 °C a aproximadamente 220 °C, o durante aproximadamente 165 °C a aproximadamente 195 °C, durante periodos que oscilan de segundos a minutos (por ejemplo, aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 60 minutos).

En algunas otras realizaciones, el pretratamiento se lleva a cabo como una etapa de expansión de fibras con amoníaco (etapa de pretratamiento AFEX).

- 25 En algunas realizaciones, el pretratamiento tiene lugar en una suspensión acuosa. En algunas realizaciones, el material celulósico está presente durante el pretratamiento en cantidades entre aproximadamente el 10 y aproximadamente el 80 % en peso, o aproximadamente el 20 y aproximadamente el 70 % en peso, o entre aproximadamente el 30 y aproximadamente el 60 % en peso, tal como aproximadamente el 50 % en peso. En algunas realizaciones, el material celulósico pretratado no se lava, mientras que en algunas otras realizaciones se lava usando cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, se lava con agua).

Pretratamiento mecánico. Cualquier método adecuado de pretratamiento mecánico encuentra uso en la presente invención.

- 35 Pretratamiento físico. Como se usa en el presente documento, el término "pretratamiento físico" se refiere a cualquier pretratamiento que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina de material celulósico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el pretratamiento físico implica irradiación (por ejemplo, irradiación microondas), exposición a vapor/explosión por vapor, hidrotérmólisis, y combinaciones de los mismos.

40 En algunas realizaciones, el pretratamiento físico implica alta presión y/o alta temperatura (explosión por vapor). En algunas realizaciones, "alta presión" significa presión en el intervalo de aproximadamente 300 a aproximadamente 600 psi, o aproximadamente 350 a aproximadamente 550 psi, o aproximadamente 400 a aproximadamente 500 psi, tal como aproximadamente 450 psi. En algunas otras realizaciones, "alta temperatura" significa temperaturas en el intervalo de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 300 °C, o aproximadamente 140 °C a aproximadamente 235 °C. En algunas realizaciones, el pretratamiento mecánico se realiza en un sistema de hidrolizador de pistola de vapor de proceso discontinuo que usa alta presión y alta temperatura como se ha definido anteriormente (por ejemplo, un hidrolizador Sunds disponible de Sunds Defibrator AB, Suecia).

50 Pretratamiento físico y químico combinado. En algunas realizaciones, el material celulósico se pretrata tanto físicamente como químicamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etapa de pretratamiento implica tratamiento con ácido diluido o débil y tratamiento a alta temperatura y/o presión. Los pretratamientos físicos y químicos pueden llevarse a cabo secuencialmente o simultáneamente, según se desee. En algunas realizaciones también se incluye un pretratamiento mecánico.

- 55 Por consiguiente, en algunas realizaciones, el material celulósico se somete a pretratamiento mecánico, químico y/o físico, o cualquier combinación de los mismos, para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

60 Pretratamiento biológico. En algunas realizaciones, los procesos de pretratamiento biológico encuentran uso en la presente invención. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar aplicar microorganismos solubilizantes de lignina (véanse, por ejemplo, Hsu, "Pretreatment of Biomass", en *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization* (Wyman, ed.), Taylor & Francis, Washington, D.C., pp. 179-212 [1996]; Ghosh y Singh, *Adv. Appl. Microbiol.*, 39:295-333 [1993]; McMillan, "Pretreating Lignocellulosic Biomass: a Review, in *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (Himmel et al. eds.), ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, D.C., Capítulo 15 [1994]; Gong et al., 65: 207-241 [1999]; Olsson y Hahn-Hagerdal, *Enz. Microb. Tech.*, 18:312-331 [1996]; y Vallander y Eriksson, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 42:63-95 [1990]).

65

En algunas realizaciones, los compuestos solubles derivados del proceso de pretratamiento se separan posteriormente de los sólidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etapa de separación comprende uno o más de medios mecánicos estándar tales como cribado, tamizado, centrifugación y/o filtración para lograr la separación.

5 En algunas otras realizaciones, los compuestos solubles no se separan de los sólidos tras el pretratamiento. Se apreciará que el pretratamiento puede realizarse como un proceso discontinuo, de lotes alimentados o continuo. También se apreciará que el pretratamiento puede realizarse a consistencia de sólidos baja, media o alta (véase, por ejemplo, el documento WO 2010/022511).

10 Fermentación

En algunas realizaciones, los métodos de generación de glucosa proporcionados en el presente documento comprenden además la fermentación de los azúcares fermentables resultantes (por ejemplo, glucosa) a un producto final. Los organismos de fermentación especialmente adecuados son capaces de fermentar (es decir, convertir),
15 azúcares, tales como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y/o arabinosa, directamente o indirectamente en al menos un producto final deseado.

En algunas realizaciones, la levadura que encuentra uso en la presente invención incluye, pero no se limita a, cepas del género *Saccharomyces* (por ejemplo, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*), cepas del género *Pichia* (por ejemplo, *Pichia stipitis*, tal como CBS 5773 de *Pichia stipitis* y *Pichia pastoris*), cepas del género *Candida* (por ejemplo, *Candida utilis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis* y *Candida boidinii*). Otros organismos fermentadores incluyen, pero no se limitan a, las cepas de *Zymomonas*, *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorpha* y *Hansenula anomala*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces fragilis*) y *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*).
20

Organismos fermentadores bacterianos adecuados incluyen, pero no se limitan a, cepas de *Escherichia* (por ejemplo, *Escherichia coli*), cepas de *Zymomonas* (por ejemplo, *Zymomonas mobilis*), cepas de *Zymobacter* (por ejemplo, *Zymobacter palmae*), cepas de *Klebsiella* (por ejemplo, *Klebsiella oxytoca*), cepas de *Leuconostoc* (por ejemplo, *Leuconostoc mesenteroides*), cepas de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium butyricum*), cepas de *Enterobacter* (por ejemplo, *Enterobacter aerogenes*) y cepas de *Thermoanaerobacter* (por ejemplo, *Thermoanaerobacter* BG1L1; véase Appl. Microbiol, Biotech. 77: 61-86; *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* y *Thermoanaerobacter mathrani*). Las cepas de *Lactobacillus* también encuentran uso en la presente invención, además de cepas de *Corynebacterium glutamicum R*, *Bacillus thermoglucosidasius* y *Geobacillus thermoglucosidasius*. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún organismo fermentador particular.
25
30
35

Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia. En algunas realizaciones que implican la fermentación de etanol por levadura, la fermentación se produce durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 120 horas, o entre
40 aproximadamente 12 y aproximadamente 96 horas. En algunas realizaciones, la fermentación se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 26 y aproximadamente 34 °C, o aproximadamente 32 °C. En algunas realizaciones, el pH de fermentación es de pH aproximadamente 3 a aproximadamente 7, o aproximadamente pH aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática y fermentación se realizan en recipientes separados de manera que cada reacción biológica pueda producirse bajo sus condiciones óptimas respectivas (por ejemplo, temperatura). En algunas otras realizaciones, el proceso para producir glucosa a partir de celulosa descrito en el presente documento se realiza simultáneamente con fermentación en una sacarificación y fermentación simultánea (SSF). La SSF normalmente se lleva a cabo a temperaturas de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 50 °C, o
50 aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, o aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C, que es un compromiso entre el óptimo a aproximadamente 50 °C para la mayoría de las mezclas enzimáticas de celulasa y el óptimo a aproximadamente 28 °C a aproximadamente 30 °C para el crecimiento de la mayoría de las levaduras.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos de generación de glucosa comprenden además fermentación de la glucosa a al menos un producto final. No se pretende que la presente invención se limite a ningún producto final particular, ya que los métodos de la presente invención son adecuados para producir una variedad de productos finales. En algunas realizaciones, los productos finales incluyen, pero no se limitan a, alcoholes combustibles y/o productos químicos industriales de precursor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los productos de fermentación incluyen productos químicos industriales de precursor tales como alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido butírico, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, 812, beta-caroteno); y/u hormonas. En algunas realizaciones, el producto final es un alcohol combustible. Alcoholes combustibles adecuados se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, butanol y alcoholes propílicos.
55
60
65

Expresión elevada de enzimas de hidrólisis de sacáridos

En algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento, la célula fúngica se modifica adicionalmente genéticamente para aumentar la producción de una o más enzimas de hidrólisis de sacáridos. En algunas realizaciones, la célula fúngica expresa en exceso al menos un gen homólogo y/o heterólogo que codifica una enzima de hidrólisis de sacáridos (por ejemplo, beta-glucosidasa). No se pretende que la presente invención se limite a ninguna enzima particular, ya que numerosas enzimas encuentran uso en la presente invención. En algunas realizaciones, la enzima es una cualquiera de una variedad de endoglucanasas, celobiohidrolasas, beta-glucosidasas, endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, acetilxilano esterasas, feruloil esterasas, alfa-glucuronil esterasas, y/o cualquier otra enzima implicada en la hidrólisis de sacáridos. En algunas realizaciones, la célula fúngica se modifica genéticamente para aumentar la expresión de beta-glucosidasa. Así, en algunas realizaciones, una célula fúngica comprende una secuencia de polinucleótidos para elevada expresión de polinucleótido que codifica beta-glucosidasa y adicionalmente puede modificarse genéticamente para delecionar polinucleótidos que codifican una o más enzimas oxidantes de glucosa y/o celobiosa endógena.

En algunas realizaciones, la enzima de hidrólisis de sacáridos es endógena a la célula fúngica. En algunas realizaciones, la enzima de hidrólisis de sacáridos es exógena a la célula fúngica. En algunas otras realizaciones, la mezcla enzimática comprende además una enzima de hidrólisis de sacáridos que es heteróloga a la célula fúngica. Todavía además, en algunas realizaciones, el proceso de generación de glucosa comprende poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende una enzima de hidrólisis de sacáridos que es heteróloga a la célula fúngica.

En algunas realizaciones, las células fúngicas de la presente invención se modifican genéticamente para aumentar la expresión de una enzima de hidrólisis de sacáridos usando cualquiera de una variedad de métodos que son conocidos para aquellos expertos en la materia. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica la enzima de hidrólisis está adaptada para elevada expresión en una célula fúngica huésped.

PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos, que incluyen experimentos y resultados logrados, se proporcionan para fines ilustrativos solo y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

En la siguiente divulgación experimental se aplican las siguientes abreviaturas: ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar), uM y μ M (micromolar); nM (nanomolar); moles (moles); gm y g (gramo); mg (miligramos); ug y μ g (microgramos); L y l (litro); ml y mL (mililitro); cm (centímetros); mm (milímetros); um y μ m (micrómetros); s (segundos); min(s) (minuto(s)); h(s) y hr(s) (hora(s)); U (unidades); MW (peso molecular); rpm (rotaciones por minuto); °C (grados centígrados); ADN (ácido desoxirribonucleico); ARN (ácido ribonucleico); HPLC (cromatografía líquida de alta presión); MES (ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico); FIOPC (veces de mejora con respecto al control positivo); YPD (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona y 20 g/l de dextrosa); SOE-PCR (fraccionamiento por PCR de extensión por solapamiento); ARS (Colección de cultivos ARS o Colección de cultivos NRRL, Peoria, IL); Axygen (Axygen, Inc., Union City, CA); Lallemand (Lallemand Ethanol Technology, Milwaukee, WI); Dual Biosystems (Dual Biosystems AG, Schlieven, Suiza); Alphalyse (Alphalyse Inc., Palo Alto, CA); Dyadic (Dyadic International, Inc., Jupiter, FL); Promega (Promega, Inc., Madison, WI); Megazyme (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Irlanda); McMaster (McMaster Regional Centre for Mass Spectrometry en Hamilton, Ontario, Canadá); Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); Dasgip (Dasgip Biotools, LLC, Shrewsbury, MA); Difco (Difco Laboratories, BD Diagnostic Systems, Detroit, MI); PCRdiagnostics (PCRdiagnostics, por SRO de *E. coli*, República eslovaca); Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA); Molecular Devices (Molecular Devices, Sunnyvale, CA); Symbio (Symbio, Inc., Menlo Park, CA); Sartorius (Sartorius AG, Goettingen, Alemania); Finnzymes (parte de Thermo Fisher Scientific, Lafayette, CO); Dionex (ahora parte de Thermo Fisher Scientific, Lafayette, CO); Idex (Idex Health and Science Group, Oak Harbor, WA); Microbeads (Microbeads A/S, Skedsmokorset, Noruega); Calbiochem (Calbiochem-Novabiochem International, Inc., La Jolla, CA); Newport (Newport Scientific, Australia); y Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

LAS SIGUIENTES SECUENCIAS DE POLINUCLEÓTIDOS Y DE POLIPÉPTIDOS ENCUENTRAN USO EN LA PRESENTE INVENCION. COMO SE MUESTRA A CONTINUACIÓN, LA SECUENCIA DE POLINUCLEÓTIDOS VA SEGUIDA DEL POLIPÉPTIDO CODIFICADO.

GO1 de *M. thermophila*:

5 ATGGGCTTCCTCGCCGCCACTCTTGTGTCTGTGCCGCTCTCGCGAGCGCAGCAA
 GCATCCCACGTCCCCATGCCAAGCGCCAGGTCTCCCAGCTTCGCGACGATTATGA
 CTTCGTGATCGTTGGCGGTGGAAGTAGCGGCCTCACTGTAGCCGATCGGCTGACA
 GAGGCCTTCCAGCCAAGAACGTCCTTGTATTGAGTATGGAGACGTCCACTACG
 CCCC GGGAACCTTCGATCCGCCGACGGACTGGATCACACCTCAGCCTGATGCC
 10 CCCCTTCTGGTCTTTCAATTCCCTCCCCAACCAGACATGGCAAACACAACAGC
 GTTTGTGCTAGCCGGCCAAGTGGTGGGTGGAAGCAGTGCCGTGAACGGCATGTT
 CTTTGACCGCGCATCCCGCCACGACTACGATGCGTGGACCGCGGTCCGGCGGGTC
 CGGGTTCGAACAGTCCAGCCACAAGTGGGACTGGGAGGGGCTGTTCCCTTTCTTC
 CAGAAGAGCGTCACGTTACGGAACCGCCGGCCGACATCGTCCAGAAGTATCAC
 15 TACACCTGGGACCTGTCTGCCTACGGCAATGGCTCAACCCCATCTACAGCAGCT
 ATCCGGTCTTCCAGTGGGCCGACCAGCCGTTACTTAACCAGGCATGGCAGGAGA
 TGGGAATCAATCCGGTGACCGAATGCGCCGGCGGGCACAAGGAGGGTGTCTGCT
 GGGTTCGCGCTCGCAGCACCTGTACGGCGAGGAGGTCCGACGCCGGGCTCG
 20 GCCACTACGCCGATGTGCTCCCGCGAGCCAATTACGACCTCCTCGTTCAACACCA
 GGTGTGACGGTAGTATTCCCAATGGGCCGAGCCACGGACCGCCGCTTGTGCA
 GGCGGGTCCCTGGCCGACAACCACCTGTTCAACGTGACTGTGAAGGGCGAAGT
 CATCATCTCGGCGGGCGCTCTGCACACCCCGACCGTCTTCAACGGAGCGGCATC
 GGCCCGGCATCCTTCTTGGACGACGCCGGGATCCCCGTGACGCTTGACCTGCCGG
 25 GCGTCCGGCGCAAACCTCCAGGACCACTGCGGTCCGCCCGTACGTGGAACATA
 CCGAGCCCTACACCGGCTTCTTCCCGCTCCCTCCGAGATGGTCAACAACGCGAC
 CTCAAAGCCGAAGCCATCACCGGCTTCGACGAGGTCCCGGCCCGCGGCCCTA
 CACGCTCGCCGGGGGCAACAACGCCATCTTCGTATCGCTCCACACCTCACGGCC
 30 GACTACGGCGCCATCACCGCAAATATCCGCGCCATGGTCCCGACCGGAACCGCC
 GCCTCTATCTCGCGCCGACGTCCGCAACATCCCGGGGATGGTGGCCGGCTAC
 GAGGCCAGCTCCTCGTGCTCGCCGACCTGCTCGACAACCCGGAGGCGCCAGC
 CTGGAGACGCCGTGGGCGACGAGCGAGGCGCCGACACGTCGTCGGTCTTGCC
 35 TTCCTGCTGACCCGCTCAGCCGCGGACGCTGCGGCTCAACCTCAGCGACCCGC
 TCGCGCAGCCCGTGTCTGACTACCGCTCCGGGTCCAACCCGGTTCGACATCGACCT
 GCACCTCGCCCACGTGCGCTTCTGCGCGGCCTGCTCGACACGCCACCATGACG
 GCCCGCGGGGCGCTCGAGACGGCCCCCGGCTCGGCCGTGGCCGACAGCGACGAG
 GCGCTGGGGGAGTACGTGCGCTCGCACAGCACGCTGTCCTTCATGCACCCGTGCT
 40 GCACGGCCGCCATGCTGCCCCGAGGACCGGGGCGGCGTCTGTCGGGCCGACCTCA
 AGGTGCACGGGGCCGAGGGCCTGAGGGTTCGTGGACATGAGCGTGATGCCGCTGT
 TGCCGGGGGCGCACCTGAGCGCCACTGCTTATGCGGTGGGGGAGAAAGCTGCGG
 ATATTATCATCCAGGAGTGGATGGACAAGGAGCAGTGA (SEQ ID NO:1)

45 MGFLAATLVSCAALASAASIPRPHAKRQVSQLRDDYDFVIVGGGTSGLTVADRLTE
 AFPKKNVLVIEYGDVHYAPGTFDPPTDWITPQPDPAPPSWSFNSLPNPDMAANTTAFVL

50 AGQVVGGSSAVNGMFFDRASRHDYDAWTA VGGSGFEQSSHKWDWEGLFPFFQKS
 VTFTEPPADIVQKYHYTWDL S AYNGSTPIYSSYPVFQWADQPLL NQAWQEMGINP
 VTECAGDKEGVCWVPASQHPVTARRSHAGLGHYADVLPRANYDLLVQHQVVRV
 VFPNGPSHGPPLEARS LADNHLFN VTKGEVIISAGALHTPTVLQRSIGPASFLDD
 55 AGIPVTLDLPGVGANLQDHCGPPVTWNYTEPYTGFFPLPSEM VNNATFKAEAITGFD
 EVPARGPYTLAGGNNAIFVSLPHLTADYGAITANIRAMVADGTAASYLAADVRTIPG
 MVAGYEAQLLV LADLLDNPEAPSLETPWATSEAPQTSSVLAFLHPLSRGSVRLNLS
 DPLAQPVL DYRSGSNPVDIDLHLAHVRFRLGLLDTPTMQARGALETAPGSAVADSD
 60 EALGEYVRSHSTLSFMHPCCTAAML PEDRGGVVGPD LKVHGAEGLRVVDM SVMPL
 LPGAHL SATAYAVGEKAADIIIQEWMDKEQ (SEQ ID NO:2)

65 GO2 de *M. thermophila*:

5 ATGGAGCTGCTTCGAGTCTCCCTCGCCGCTGTTGCACTCTCCCCATTAATATTATT
 CGGCGTTGCAGCCGCCACCCTACCGCCGATCCATTGCCCGCTCCACGATTCTT
 GACGGAGCCGATGGCCTTCTTCCGGAGTATGACTACATCATCATCGGGGGCGGC
 ACGTCCGGATTGACTGTCGCCGACAGACTCACGGAGAATAGAAAGCGCAAGTTT
 TCCCGCTCTCCCCTCCCAACGTCACCCGCCGATCGTCACCGGCGTGGTGTATT
 CTGTTCTTGTGTTTGGAAAGAGGCATTTTCCAGAACTCTAGCTCGGTGACCACCAT
 10 TTCTGGGGGAAGCAGAGGCCTCTTCGATCCAAGTCTGACCTTCAACATCAACTCC
 GTTCCCCAAGCTGGGCTGGACAACCGCAGCATTGCCGTATTGGCGGGTGTGATCC
 TCGGCGGCAGCTCCGGCGTCAACGGGCTTCAAGTCTCCGTGGACAAAGAGAAG
 ACTATGACCGCTGGGGATCGTACTTTGGGCCAAACTCTGACTGGAGTTGGAAAG
 GTCTCCTGCCGTATTTCAAGAAGGCATGGAATTTCCATCCGCCCCAGGCCAGAGCT
 15 GGTCAGTCAGTTCGACATCAAGTACGACCCAGCTACTGGGGCAACACGTCTGA
 CGTGCACGCATCTTTCCCAACCACTTTCTGGCCGGTGTCAAATTGGAGATGGCT
 GCATTTGGTGACATCCCTGGGGTCAATATCCGCCCGACTCTGCTTCTGGCGAGA
 CCGGGGCGTATTGGCACCCAGCGTCCGTTGACCCAGCGACAGTCTCCGCTCCTT
 CGCTCGGCCCGCGCATTGGGACAACATTGAGGCGGCACGTCCCAATTACCACAC
 20 CCTGACCGGGCAACGCGTATTGAAGGTGCGATTTGATGGCAATCGAGCGACCAG
 CGTCGTCTTCGTGCCGGCAATGCAACGGATCACAGCACTGCCAGGTCCGTGAA
 GGCCAAGAAGGAGATCGTCTTGGCCGCCGGCGCCATTACACGCCCCAAATCCT
 ACAGGCGAGCGGAGTAGGGCCGAAGCAGGTCCTGAAGGAAGCAGGCGTGCCGC
 25 TTGTGTTGACGCTCCCGGTGTCGGCAGCAATTTCCAAGACCAGCCGTATGTGGT
 TGCTCCCACCTTCAATTTTACCAAGTTCCCTTCCACCCGGACTTCTACGACATGA
 TTCTGAACCAGACTTTTATCGCCGAGGCTCAGGCCAGTTTGAAAAGGACCGTAC
 CGGACCTCACACCATCGCATCCGGCTATTGCGGCAGCTGGCTCCCCCTCCAGATC
 30 ATTGCCCCAAATTCGTGGAAGGACATCGCTAGGCGGTACGAATCCCAAGACCCA
 GCCGCCTACCTCCCCGCCGGCACCGATGAGACCGTCATCGAGGGGTACAGGGCG
 CAGCAGAAAGCACTAGCGAGGTCCATGAGGAGCAAGCAATCGGCAATGTATAA
 CTTCTTCTGAGGGGCGGCTACGAAGAGGGTTCTGTGCTTACTTGCACCCAACC
 35 AGCCGTGGCACCGTTCGCATCAACCGATCCGACCCCTTCTTCTCGCCGCCCGAGG
 TCGACTACAGGGCACTGAGCAACCCACCGACCTGGAGGTCCTGCTCGAATTCA
 CTCCCTTACCCGCGAGGTA CTCTTGGAGACGAGGTTGAAGTCCCTCGACCCGGT
 CGAGCTGTGCCCCGGTGCCAACGTCACGGCGCCCGCCGACATCGAGGCCTGGCT
 40 TCGCAGCGTCATGATCCCGTCTCCTTCCATCCCATCGGCACGGCCCGCCATGTTG
 CCTAGGCACCTCGGTGGTGTGCTGGACGAGAACCTTCTGGTGTACGGGGTCGAA
 GGCTTGAGTGTGTCGACGCCAGCGTCATGCCCGACTTGCCGGGCTCATAACCGC
 AGCAGACCGTGTATGCTATTGCTGAGAAGGCCGCGGATCTCATTAAAGAGCAGGG
 CTTGA (SEQ ID NO:3)

45
 50 MELLRVSLAAVALSPLILFGVAAAHPTARSIARSTILDGADGLLPEYDYIIIGGTSGL
 TVADRLTENRKRKFSRSPLEPTSPARSSPAWCYSVLVLERGIFQNSSSVTTISGSRGLF
 DPSLTFNINSVPQAGLDNRSIAVIGGLILGGSSGVNGLQVLRGQREDYDRWGSYFPG
 NSDWSWKGLLPYFKKAWNFHPPPELVSQFDIKYDPSYWGNTSDVHASFPPTTFWPV
 LKLEMAAFGDIPGVEYPPDSASGETGAYWHPASVDPATVLRSFARPAHWDNIEAAR
 55 PNYHTLTGQRVLKVAFDGNRATSVVFPANATDHSTARSVKAKKEIVLAAGAIHTP
 QILQASGVGPKQVLKEAGVPLVVDAPGVGSNFQDQPYVVAPTFNFTKFPFHPDFYD
 MILNQTFIAEAQAQFEKDRTPHTIASGYCGSWLPLQIIAPNSWKDIARRYESQDPAA
 YLPAGTDETVIEGYRAQQKALARSMRSKQSAMYNFFLRGGYEEGSSVYLHPTSRGT
 VRINRSDPFFSPPEVDYRALSNPTDLEVLLEFTPFTRRYFLETRLKSLDPVELSPGANV
 60 TAPADIEAWLRSMIPSSFHPIGTAAMLPRHLGGVVVDENLLVYGVEGLSVVDASVM
 PDLPGSYTQQTVYAIAEKAADLIKSRA (SEQ ID NO:4)

CDH1 de *M. thermophila*:

65

5 ATGAGGACCTCCTCTCGTTTAATCGGTGCCCTTGCGGCGGCACTCTTGCCGTCTG
 CCCTTGCGCAGAAACAACGCGCCGGTAACCTTACCCGACCCGGACTCGGGCATT
 CCTTCAACACGTGGGGTCTCGCCGAGGATTCTCCCCAGACTAAGGGCGGTTTCAC
 TTTTGGTGTGCTCTGCCCTCTGATGCCCTCACGACAGACGCCAAGGAGTTCATC
 GGTTACTTGAAAATGCGCGAGGAACGATGAGAGCGGTTGGTGCGGTGTCTCCCTG
 GGCGGCCCCATGACCAACTCGCTCCTCATCGCGGCCTGGCCCCACGAGGACACC
 10 GTCTACACCTCTCTCCGCTTCGCCACCGGCTATGCCATGCCGGATGTCTACCAGG
 GGGACGCCGAGATCACCCAGGTCTCCTCCTCTGTCAACTCGACGCACTTCAGCCT
 CATCTTCAGGTGCGAGAACTGCCTGCAATGGAGTCAAAGCGGGCCACCGGCGG
 TGCTCCACCTCGAACGGCGTGTGGTCCCTCGGCTGGGTCCAGGCATTGCGCCGAC
 CCCGGCAACCCGACCTGCCCCGACCAGATCACCTCGAGCAGCACGACAACGGC
 15 ATGGGTATCTGGGGTGGCCAGCTCAACTCCGACGCCGCCAGCCCGTCTACACC
 GAGTGGGCCGCCAGGCCACCAAGACCGTACGGGTGACTGCGGGCGGTCCCACC
 GAGACCTCTGTCTCGTTCGGTGTCCCCGTTCCGACGGGGCGTCTCGTTCGATTACATCG
 TCGTGGGCGGCGGTGCCGGTGGCATCCCCGCCGCCGACAAGCTCAGCGAGGCCG
 20 GCAAGAGTGTGCTGCTCATCGAGAAGGGCTTTGCCTCGACCGCCAACACCGGAG
 GCACTCTCGGCCCCGAGTGGCTCGAGGGCCACGACCTTACCCGCTTTGACGTGCC
 GGGTCTGTGCAACCAGATCTGGGTTGACTCCAAGGGGATCGCTTGCGAGGATAC
 CGACCAGATGGCTGGCTGTGTCTCGGCGGGCGGTACCGCCGTGAATGCCGGCCT
 GTGGTTCAAGCCCTACTCGCTCGACTGGGACTACCTCTTCCCTAGTGGTTGGAAG
 25 TACAAAGACGTCCAGCCGGCCATCAACCGCGCCCTCTCGCGCATCCCGGGCACC
 GATGCTCCCTCGACCGACGGCAAGCGCTACTACCAACAGGGCTTCGACGTCTCT
 CCAAGGGCCTGGCCGGCGGGCGGTGGACCTCGGTACGGCCAATAACGCGCCAG
 ACAAGAAGAACCGCACCTTCTCCCATGCCCCCTTATGTTCCGCCGGCGGCGAGC
 30 GCAACGGCCCCGCTGGGCACCTACTTCCAGACCGCCAAGAAGCGCAGCAACTTCA
 AGCTCTGGCTCAACACGTCCGTCAAGCGCGTCAATCCGCCAGGGCGGCCACATCA
 CCGGCGTCGAGGTCGAGCCGTTCCGCGACGGCGGTTACCAAGGCATCGTCCCCG
 TCACCAAGGTTACGGGCCGCGTCACTCTCTGCCGGTACCTTTGGCAGTGCAAA
 35 GATCCTGTGAGGAGCGGTATCGGTCCGAACGATCAGCTGCAGGTTGTGCGGGC
 CTCGGAGAAGGATGGCCCTACCATGATCAGCAACTCGTCTGGATCAACCTGCC
 TGTGCGGCTACAACCTGGATGACCACCTCAACACCGACACTGTATCTCCCACCCC
 GACGTGCTGTTCTACGACTTCTACGAGGCGTGGGACAATCCCATCCAGTCTGACA
 40 AGGACAGCTACCTCAACTCGCGCACGGGCATCCTCGCCAAGCCGCTCCCAACA
 TTGGGCCTATGTTCTGGGAAGAGATCAAGGGTGCGGACGGCATTGTTCCGCAGC
 TCCAGTGGACTGCCCCTGTGCGAGGGCAGCTGGGTGCCCCCAACGGCAAGACCA
 TGACCATGTGCGAGTACCTCGGTCTGTTGGTACCCTCGCGCGGCCGCATGACCAT
 CACCCCGTCCCTGACAACTGTCTGTCGACGTGCCCTACCTCAAGGACCCCAAC
 45 GACAAGGAGGCCGTATCCAGGGCATCATCAACCTGCAGAACGCCCTCAAGAAC
 GTCGCCAACCTGACCTGGCTCTTCCCCAACTCGACCATCACGCCGCGCCAATACG
 TTGACAGCATGGTCTCTCCCCGAGCAACCGGCGCTCCAACCACTGGATGGGCA
 CCAACAAGATCGGCACCGACGACGGGCGCAAGGGCGGCTCCGCCGCTCGTCCGACC
 50 TCAACACCAAGGTCTACGGCACCGACAACCTCTTCGTATCGACGCCTCCATCTT
 CCCC GGCGTGCCACCACCAACCCACCTCGTACATCGTGACGGCGTCCGAGCA
 CGCCTCGGCCCGCATCCTCGCCCTGCCCGACCTCACGCCCGTCCCAAGTACGGG
 CAGTGGCGGGCCGCGAATGGAGCGGCAGCTTCGTCTGCGCCGACGGCTCCACG
 TGCCAGATGCAGAACGAGTGGTACTCGCAGTGTCTGTGA (SEQ ID NO:5)

55

60

65

5 MRTSSRLIGALAAALLPSALAQNNAPVTFTDPDSGITFNTWGLAEDSPQTKGGFTFG
 VALPSDALTTDAKEFIGYLKCARNDESGWCGVSLGGPMTNSLLIAAWPHEDTVYTS
 LRFATGYAMPDVYQGDAEITQVSSSVNSTHFSLIFRCENCLQWSQSGATGGASTSNG
 10 VLVLGWVQAFADPGNPTCPDQITLQHDNGMGIWGAQLNSDAASPSYTEWAAQAT
 KTVTGDCCGGPTETSVVGVPTGVSFDYIVVGGGAGGIPAADKLSEAGKSVLLIEKG
 FASTANTGGTLGPEWLEGHDLTRFDVPGLCNQIWVDSKGIACEDTDQMAGCVLGG
 GTAVNAGLWFKPYSLDWDYLFPSGWKYKDVQPAINRALSRIPTDAPSTDGKRY
 15 QQGFVLSKGLAGGGWTSVTANNAPDKKNRTFSHAPFMFAGGERNGPLGTYFQTA
 KKRSNFKLWLNTSVKRVIRQGGHITGVEVEPFRDGGYQGIVPVTKVTGRVILSAGTF
 GSAKILLRSGIGPNDQLQVVAASEKDGPMTMISNSSWINLPVGYNLDDHLNTDTVISHP
 DVVFDYFYEAWDNPIQSDKDSYLSRTGILAQAAAPNIGPMFWEEIKGADGIVRQLQ
 20 WTARVEGSLGAPNGKTMMSQYLGRGATSRGRMTITPSLTTVVSDVPYLKDPNDK
 EAVIQGIINLQNALKNVANLTLWLPNSTITPRQYVDSMVVSPSNRRSNHWMGTNKIG
 TDDGRKGGSAVVDLNTKVYGTDLNFVIDASIFPGVPTTNPTSIVTASEHASARILAL
 PDLTPVPKYQCGGREWSGSFVCADGSTCQMNEWYSQCL (SEQ ID NO:6)

25 CDH2 de *M. thermophila*:

ATGAAGCTACTCAGCCGCGTTGGGGCGACCGCCCTAGCGGCGACGTTGTCCTG
 CAGCAATGTGCAGCCCAGATGACCGAGGGGACCTACACCGATGAGGCTACCGGT
 ATCCAATTCAAGACGTGGACCGCCTCCGAGGGCGCCCCTTTCACGTTTGGCTTGA
 CCCTCCCCGCGGACGCGCTGGAAGGATGCCACCGAGTACATTGGTCTCCTGC
 GTTGCCAAATACCGATCCCGCCTCGCCAGCTGGTGGGTATCTCCACGGCCA
 30 GTCCGGCCAGATGACGCAGGCGCTGCTGCTGGTCCGCTGGGCCAGCGAGGACAC
 CGTCTACACGTCGTTCCGCTACGCCACCGGCTACACGCTCCCCGGCCTCTACCG

30

35

40

45

50

55

5 GGCACGCCAAGCTGACCCAGATCTCCTCCTCGGTCAGCGAGGACAGCTTCGAG
 GTGCTGTTCCGCTGCGAAAACCTGCTTCTCCTGGGACCAGGATGGACCAAGGGC
 AACGTCTCGACCAGCAACGGCAACCTGGTCTCCTCGGCCGCGCCCGCCGGAAGGAT
 10 GGTGTGACGGGCCCCACGTGCCCGGACACGGCCGAGTTCGGTTCATGATAAC
 GGTTTCGGACAGTGGGGTGCCGTGCTTGAGGGTGCTACTTCGGACTCGTACGAG
 GAGTGGGCTAAGCTGGCCACGACCACGCCCGAGACCACCTGCGATGGCACTGGC
 CCCGGCGACAAGGAGTGCCTCCGGCTCCCGAGGACACGTATGATTACATCGTT
 15 GTCGGTGCCGGCGCCGGTGGTATCACCGTCGCCGACAAGCTCAGCGAGGCCGGC
 CACAAGGTCCTTCTCATCGAGAAGGGACCCCTTCGACCCGGCCTGTGGAACGGG
 ACCATGAAGCCCGAGTGGCTCGAGAGCACCGACCTTACCCGCTTCGACGTTCCC
 GGCCTGTGCAACCAGATCTGGGTGACTCTGCCGGCATCGCCTGCACCGATACC
 20 GACCAGATGGCGGGCTGCGTTCTCGGCCGTGGCACCGCTGTCAACGCTGGTTTGT
 GGTGGAAGCCCCACCCCGCTGACTGGGATGAGAACTTCCCCGAAGGGTGAAGT
 CGAGCGATCTCGCGGATGCGACCGAGCGTGTCTTCAAGCGCATCCCCGGCACGT
 CGCACCCGTCGCAGGACGGCAAGTTGTACCGCCAGGAGGGCTTCGAGGTCATCA
 25 GCAAGGGCCTGGCCAACGCCGGCTGGAAGGAAATCAGCGCCAACGAGGCGCCC
 AGCGAGAAGAACCACACCTATGCACACACCGAGTTCATGTTCTCGGGCGGTGAG
 CGTGGCGGCCCCCTGGCGACGTACCTTGCTCGGCTGCCGAGCGCAGCAACTTC
 AACCTGTGGCTCAACACTGCCGTCCGGAGGGCCGTCCGCAGCGGCAGCAAGGTC
 ACCGGCGTCGAGCTCGAGTGCCACACGGACGGTGGCTTCAGCGGGACCGTCAAC
 30 CTGAATGAGGGCGGTGGTGTATCTTCTCGGCCGGCGCTTTCGGCTCGGCCAAGC
 TGCTCCTTCGCAGCGGTATCGGTCTGAGGACCAGCTCGAGATTGTGGCGAGCTC
 CAAGGACGGCGAGACCTTCACTCCCAAGGACGAGTGGATCAACCTCCCCGTCGG
 CCACAACCTGATCGACCATCTCAACACTGACCTCATTATCACGCACCCGGATGTC
 35 GTTTTCTATGACTTCTATGCGGCCTGGGACGAGCCCATCACGGAGGATAAGGAG
 GCCTACCTGAACTCGCGGTCCGGCATTCTCGCCCAGGCGGGCCCAATATCGGCC
 CTATGATGTGGGATCAAGTACGCCGTCCGACGGCATCACCCGCCAGTTCAGT
 GGACATGCCGTGTTGAGGGCGACAGCTCCAAGACCAACTCGACCCACGCCATGA
 CCCTCAGCCAGTACCTCGGCCGTGGCGTCTCGCGCGGCCGGATGGGCATCA
 40 CCTCCGGGCTGAGCACGACGGTGGCCGAGCACCCGTACCTGCACAACAACGGCG
 ACCTGGAGGCGGTCATCCAGGGGATCCAGAACGTGGTGGACGCGCTCAGCCAGG
 TGGCCGACCTCGAGTGGGTGCTCCCGCCGCCCCGACGGGACGGTGGCCGACTACG
 TCAACAGCCTGATCGTCTCGCCGGCCAACCGCCGGGCCAACCACTGGATGGGCA
 CGGCCAAGCTGGGCACCGACGACGGCCGCTCGGGCGGCACCTCGGTGCTCGACC
 45 TCGACACCAAGGTGTACGGCACCGACAACCTGTTCTGTCGTCGACGCGTCCGTCTT
 CCCCAGCATGTGACGGGCAACCCGTCCGCCATGATCGTCATCGTGGCCGAGCA
 GCGGCGCAGCGCATCCTGGCCCTGCGGTCTTAA (SEQ ID NO:7)

45 MKLLSRVGATALAATLSLQQCAAQMTEGTYTDEATGIQFKTWTASEGAPFTFGLTL
 PADALEKDATEYIGLLRCQITDPASPSWCGISHGQSGQMTQALLLVAWASEDTVYTS
 FRYATGYTLPGLYTGDAKLTQISSVSSEDSFEVLFRCENCFSWDQDGTGNVSTSN
 50 NLVLGRAAAKDGVTGPTCPDTAEFGFHDNGFGQWGAVLEGATSDSYEEWAKLATT
 TPETTCGDTGPGDKECVPAPEDTYDYIVVGAGAGGITVADKLSEAGHKVLLIEKPP
 STGLWNGTMKPEWLESTDLTRFDVPGLCNQIWVDSAGIACTDQDQMGCVLGGGT
 AVNAGLWWKPHPADWDENFPEGWKSSDLADATERVFKRIPGTSHPSQDGKLYRQE
 GFEVISKGLANAGWKEISANEAPSEKNHTYAHTEFMFSGGERGGPLATYLASAAERS
 55 NFNLWLNTAVRRAVRSGSKVTGVELECLTDGGFSGTVNLNEGGGVIFSAGAFGSAK
 LLLRSGIGPEDQLEIVASSKDGETFTPKDEWINLPVGHNLIDHLNTDLIITHPDVVFYD
 FYAAWDEPITEDKEAYLNSRSGILAQAAPNIGPMMWDQVTPSDGITRQFQWTCRVE
 GDSSKTNSTHAMTSLQYLGRGVVSRGRMGITSGLSTTVAEHPYLHNNGDLEAVIQGI
 60 QNVVDALSQVADLEWVLPDPDGTVADYVNSLIVSPANRRANHWMGTAKLGTDDG
 RSGGTSVVDLDTKVYGTDLNLFVVDASVFPGMSTGNPSAMIVIVAEQAQRILALRS
 (SEQ ID NO:8)

5 ATGTCCATGACATCAGGACGTCAAGCGTTTACTTCCGAGTGCAGAGATTCAAATA
 CCACAAATTCATTTTGGTTGGCTAATTCACCGACTCTCACACTTGGCTCTACGAT
 GCAGGTCGTGGGGTCCGGCCCCATCGGCGCCACCTATGCCAAGATTCTAGCTGA
 CGCCGGCAAGGATGTCCTCATGGTTGAGACTGGCACCCAGGAAAGTAAGATTGC
 TGGAGAGCATAAGAAGAATGCTATCAACTACCAGAAAGATATCGATGCCTTTGT
 GCATGTCATTAAGGTAATCAGCTCAAGAATTAGCACCTTTGAGTGTATTTCTCTA
 10 ACTTTTCGATCTTCTCCTCTTTTCAGGGAAGTCTACACTACACGTCTGTACCGACCA
 ACAAAGCCGCCGTTTCTTACACTGGCTCCGATCTCCTGGAAAGCGAACGGCCAAA
 TTTTCAACGGACAGAATCCCCGCCAGGATCCAAACGTAAACCTGGATGCCAATG
 GTGTGGCACGTAATGTGGGCGGCATGTCTACCCACTGGACTTGTGCGACTCCCCG
 15 ACAGAAAGAGAAGGTTGAACGCAGCGATATATTCAGTGGTGACGAATGGGATA
 GCCTGTACAAGGAGGCAGAAAAGTTGATCGGAACCAGCAAGACTGTGCTGAATG
 ACTCGATCCGGCAAGAATTGGTTCATGGAGATTCTGAATGACGAGTACGGGAAGC
 GATCAGCCGAACCACTACCTTTGGCTGCAAAGAGGAATGGCAATACGGCCTACA
 20 TCACTTGGTTCATCCTCGTCAACTATCCTTGACGCGATGAACTGTAAGAAGAAATT
 TACACTATGGCCCCGAGCACCCTGTGAGAAGTTTAAAGTTCGAGGAAACAGATAA
 CGGGCCACAGGTCACCAAGGCTATAATCCGCAAACCTCGCCACAGATAAACTGAT
 TACAGTTAAGGCGAAAGTATTTATCGCTTGCGGGGGCCTATACTTACACCCAG
 25 CTACTTTTCAATTCGGGCTTCGTGCCGACAAAGCCCAACAGGGATCCCAGAACCC
 AAATACCATFAGAAGACGACGAGAAAGGCATCCCACCTCCACCGGATACTCTGG
 AGCATCTCAAGCTTCTGCTCTAGGACGCTATCTGACAGAGCAAAGCATGTGCTT
 CTGCCAAATTGTTCTGAAAAAGAATGGATTGAGGCAGTGGCTAATCCAAAAA
 GAACCCTTATCAAAGCGATGGGGTGAAACGCAAAAAGTGGGAGAAGCTCAAGG
 30 AAGGGTGAAGGAAAGGGTCCAGGAACATATGAAAAGGTTTAAATGACCCTATTC
 CCTTCCCGTTCGATGATTTGGACCCTCAGGTTACTCTACCCTTGGACTATCACCAT
 CCGTGGCATACCCAAATCCATCGCGATGCCTTCTCCTATGGCGCAGCACCCCCAG
 CCATTGATAAGCGGACCATTTGTTGACCTCCGATTCTTCGGAACGGTTGAGCCGGA
 35 CTGGAAGAACTATGTGACCTTTGAAACCGACATCAGGGATGCGTACGGCATGCC
 CCAGCCCACCTTCCGCTACAAGCTGAACGATGAGGATCGCAAACGGTTCGCACCA
 GATGATGAAAGATATGGAAGAGGCCGCTGGTGTCTTGGGTGGCTACCTCCCAGG
 GTCCGAGCCTCAATTTCTAGCTCCTGGCCTTGCACTGCACGTCTGTGGTACCCT
 40 AGAGCTCAGAAGAAGGAGAAAGAGTGTGACCCTGATCCCAAAGAGACCTCGTG
 CTGCGATGAGAACTCCAAGATCTGGGGTATCCCAAACCTGTACGTGGGTGGGTT
 AAATGTGATCCCTGGTGCCAATGGGTCCAACCCTACCTTGACAGCAATGTGCTTC
 GCCATCAAAGCGCGAAGAGTATCCTTGAAGGGAATTCTTAG (SEQ ID NO:9)

45 MSMTSGRQAF TSECRDSNTTNSFWLANSPTLTLGSTMQVVGSGPIGATYAKILADA
 GKDVLMVETGTQESKIAGEHKKNAINYQKDIDAFVHVIVISSRISTFECISLTFDLLL
 FQGLSHYTSVPTNKAAVPTLAPISWKANGQIFNGQNPRQDPNVNLDANGVARNVGG
 50 MSHWTCATPRQKEKVERSDIFSGDEWDSLYKEAEKLGTSKTVLNDIRSIRQELVMEI
 LNDEYGKRSAEPLPLAAKRNGNTAYITWSSSTILDAMNCKKKFTLWPEHHCEKFK
 VEETDNGPQVTKAIIRKLATDKLITVKAKVFIACGGPILTPQLLFNSGFVPTKPNRDR
 TQIPLEDDEKGIPPPDTLEHLKLPALGRYLTEQSMCFQIVLKKEWIEAVANPKKNP
 55 YQSDGVKRKKWEKLEKWKERVQEHMKRFNDPIPFDDLDLPQVTLPLDYHHPWH
 TQIHRDAFSYGAAPPAIDKRTIVDLRFFGTVEPDWKNYVTFETDIRDAYGMPQPTFR
 YKLNDEDRKRSHQMMKDMEEAAGALGGYLPGSEPQLAPGLALHVCGTTRAQKK
 EKECDPDPKETS CCDENSKIWGIHNLVYVGLNVIPGANGSNPTLTAMCFAIKSAKSIL
 60 EGNS (SEQ ID NO:10)

Glucó-oligosacárido oxidasa de *Acremonium strictum*:

65

5 ATGGTGCGCATCCAAGAGCTACCGCGGCCTTGAGCCTCGCCTCAGTGGTCCAG
 GCTTCATGGATCCAGAAGCGCAACTCAATCAACGCCTGTCTCGCCGCCGCCGAC
 GTCGAGTTCACGAGGAAGACTCTGAAGGCTGGGACATGGACGGCACAGCCTTC
 AACCTCCGCGTCGACTACGACCCAGCTGCCATTGCCATCCCTCGCTCCACCGAGG
 ATATCGCTGCTGCTGTCCAGTGCGGTCTTGATGCTGGTGTGCAGATCTCCGCCAA
 GGGTGGTGGTACAGTTACGGTCTTATGGGTTCGGTGGTGAAGGATGGTCATCTT
 10 ATGTTGGAGCTGGATCGTATGTACCGTGTGTGCGTTGATGATAATAATGTGGCGA
 CTATTCAGGGCGGTGCTCGTCTTGGATACACTGCTCTCGAGCTTCTTGACCAGGG
 TAACCGTGCACCTTCTCACGGTACTTGCCCTGCCGTCCGGTGTCCGGCGGTACGTC
 CTCGGCGGTGGTTACGGTTTCGCAACCCACACCCACGGTCTGACCCTCGACTGGC
 TGATCGGCGCCACCGTCGTTCTCGCTGATGCCTCCATCGTGCACGTCTCCGAGAC
 15 CGAGAACGCCGATCTCTTCTGGGCCCTCCGTGGCGGGCGGCGGTGGTTTCGCCATC
 GTCTCCGAGTTCGAGTTCAACACCTTCGAGGCCCCCGAGATCATCACCCTTACC
 AGGTCACCACCACCTGGAACCGGAAGCAGCACGTTGCCGGTCTCAAGGCTCTCC
 AGGACTGGGCTCAGAACACCATGCCCAGGGAGCTCAGCATGCGTCTTGAGATCA
 ACGCCAACGCTCTCAACTGGGAGGGTAACTTCTTCGGTAACGCCAAGGACCTCA
 20 AGAAGATTCTTCAGCCTATCATGAAGAAGGCGGGTGGCAAGTCTACCATTCCA
 AGCTCGTTGAGACCGATTGGTATGGCCAGATCAACACCTACCTCTACGGTGTGA
 CTTGAACATCACCTACAACACTACGACGTCCACGAGTACTTCTACGCCAACAGCTTG
 ACCGCTCCCCGTCTCTCCGACGAAGCCATCCAAGCCTTCGTCGACTACAAGTTCCG
 25 ACAACTCCTCCGTCCGCCCGGCCGCGGCTGGTGGATTCAATGGGACTTCCACGG
 CGGCAAGAACTCTGCCCTGGCCGCGCTCTCCAACGACGAAACCGCCTACGCCCA
 CCGCGACCAGCTCTGGCTCTGGCAGTTCTACGACAGCATCTATGACTACGAGAA
 CAACACCTCTCCCTACCCGGAGAGCGGTTTTGAGTTCATGCAGGGCTTCGTCGCT
 30 ACCATCGAGGACACTCTCCCTGAGGACAGGAAGGGCAAGTACTTCAACTACGCC
 GACACCACGCTTACCAAGGAGGAGGCGCAGAAGTTGTAAGTGGAGGGGCAACCTT
 GAGAAGTTGCAGGCTATCAAGGCCAAGTACGATCCTGAGGATGTGTTTGGTAAT
 GTTGTCTCTGTTGAGCCATTGCCTAG (SEQ ID NO:11)

35 MVRIQELTAALSASVQASWIQKRNSINACLAAADVEFHEEDSEGWDMDGTAFNL
 RVDYDPAIAIAPRSTEDIAAAVQCGLDAGVQISAKGGGHSYGSYGFGEEDGHMLLE
 LDRMYRVSVDNNVATIQQGARLGYTALELLDQGNRALSHGTCPAVGVGGHVLGG
 40 GYGFATHHGLTLDWLIGATVVLADASIVHVSETENADLFWALRGGGGGFAIVSEF
 EFNTFEAPEIITTYQVTTTWNRKQHVAGLQALQDWAQNTMPRELSMRLEINANLN
 WEGNFFGNAKDLKILQPIMKKAGGKSTISKLVETDQWYQINTYLYGADLNITYNY
 DVHEYFYANSLTAPRLSDEAIQAFVDYKFDNSSVRPGRGWWIQWDFHGGKNSALA
 45 AVSNDETAYAHRDQLWLWQFYDSIYDYENNTSPYPESGFEMQGFVATIEDTLPED
 RKGKYFN YADTTLTKEEAQKLYWRGNLEKLQAIKAKYDPEDVFGNVVSVEDIA
 (SEQ ID NO:12)

50 Piranosa deshidrogenasa de *Agaricus bisporus*:

55

60

65

5 ATGATACCTCGAGTGGCCAAATTCAACTTTTCGACTCTTGTCTCTCGCATTATTGG
 GGATTCAGGTTGCACGCAGTGCCATCACATACCAAAAACCCGACCGATTTACCTG
 GTGACGTTGACTATGATTTTCATCGTTGCTGGCGGTGGAAGTGCAGGTTTAGTTGT
 GGCTTCTCGTCTCAGTGAGAATCCGGAATGGAATGTACTGGTCATCGAGGCCGG
 GCCTTCCAACAAGGACGTCTTCGAAACACGGGTCCCTGGCCTTTCTTCGGAACTC
 CGGCCACGTTTTGATTGGAATTATACAACGATTCCCTCAAGATGCTCTCGGTGGCA
 10 GGAGCCTGAATTACTCGAGGGCGAAGCTCTTAGCGGTTGCAGTAGCCATAATG
 GGATGGTTTACACACGATGTTTCGAGAGACGATTGGGACAATTATGCCGAAATCA
 CCGGTAATCAAGCATTTAGCTGGGACAGCATCCTACCTGTCATGAAGAGGGCTG
 AGAAATTCAGTAAAGATTCCCTCATAAACCAGGTAAGGGCCATATTGACCCCTC
 15 CGTGCACGGTGGTGACGGAAAATTGTCCGTGGTCCGATCATAACCAACGCCCTC
 TTCAATGACTTATTACTTGAAACCGCGAAAGAATTAAGCGGTGAATTTCCGTTT
 AAATTGGATATGAATGACGGGCGGCCCTTTGGATTAACCTTGGACTCAGTATACG
 ATTGATCAACGCGGGGAGCGGAGCAGCTCTGCAACAGCGTATTTAGAGGGTACT
 20 GGAAATAACGTCCATGTCTTGGTTAACTCTTGTACCCGTATAGTCTCAGCAG
 AAAATGGGACCGACTTCCGAAGCGTTCGAGTTTGTACTGATGCCGACAGCCCAA
 AGATCCAATTACGAGCGAAAAAGGAAGTCATTGTATCTGGAGGAGTCATCAATT
 CGCCTCAGATCCTCATGAATTCCGGCATTGGGGGCCGAGAGGTGCTTGGAGCTA
 25 ATGGAATTGACACATTGGTGGATAATCCGAGTGTTCGGGAAAAATTTATCGGACC
 AGGCTGCAACAATTATAATGCTCGATAACAACACTCCCTATTACTGATTATGATGT
 TGATGCAGCGCTTATTGAATGGAAGAAGTCGCACACTGGACCTTAGCCCAAAGG
 AGGTGCGCTAAACCACCTTACATGGGTACGATTGCCTGATGACAAGCTGGATGG
 ACTTGATCCTTCAAGTGGCGAAAATTCGCCACATATTGAGTTCCAATTCGGGCAA
 30 ATTAGCCACCAGCTCCCTCCAGTGGTCTAACACGTTTTAGCTTCTATCGACACT
 GTTCTCCAATTCGCGGTTGATCAACCTCTACACTGTTTCGCGGGGTTCTATTTCT
 CTCAGTAACAACGATCCGTTCTCCACCCACTCATCGATCTCAACATGTTTGGAG
 AGGAAATAGATCCCGCTATTCTGCGTGAGGGTATTCGCAGTGCCCCGAAGAATGC
 TTTCTTCCAAGCATTCAAAGGCTTTGTTCGGTGAAACGGTGTTCCTCCAAGCGA
 35 CGCTACCTCTGATGAAGATTTGGATACCTTCCCTCAAACGTCACGTTTTCTTAC
 GTGCATGGTGTGGGAACGTTGTCTATGTCTCCTCAGAGTGCCTCGTGGGGTGTGC
 TTAACCCTGATTTCCGTGTCAAAGGAACCAGTGGCCTGCGGGTGTTCGACGCGTC
 TGTGATTCCATTCGCTCCGGCGGGGCACACTCAAGAACCTGTTTATGCATTTGCT
 40 GAGCATGCAAGTGTGTTAATAGCGAAGAGCTACAGCTAA (SEQ ID NO:13)

45 MIPRVAKFNFRLLSLALLGIQVARSAITYQNPTDLPDGDVDYDFIVAGGGTAGLVVAS
 RLSENPEWNVLVIEAGPSNKDVFETRVPLSSELRPRFDWNYTTIPQDALGGRSLNY
 SRAKLLGGCSSHNGMVYTRCSRDDWDNYAEITGNQAFSWSILPVMKRAEKFSKD
 SSHKPVKGHIDPSVHGGDGKLSVVASYTNASFNDLLETAKELSGEFPFKLDMNDG
 RPLGLTWTQYTIDQRGERSSSATAYLEGTGNNVHVLVNTLVTRIVSAENGTDFRSVE
 FATDADSPKIQLRAKKEVIVSGGVINSPQILMNSGIGGREVLGANGIDTLVDNPSVGK
 50 NLSDQAATIIMLDTTLPITDYDVDAALIEWKKSHTGPLAQGGRLNHLTWVRLPDDKL
 DGLDPSSGENSPHIEFQFGQISHQLPPSGLTRFSFYRHCSPIPPLINLYTVSRGSISLNN
 DPFSLPLIDLNMFGEEIDPAILREGIRSARRMLSSQAFKGFVGETVFPPSDATSDEDLD
 TFLKTSTFSYVHGVGTLSMSPQSASWGVVNPDFRVKGTSGLRVVDASVIPFAPAGHT
 QEPVYAFAEHASVLIAKSYS (SEQ ID NO:14)

Glucosa deshidrogenasa de *Talaromyces stipitatus*, (ATCC 10500):

60

65

5 ATGCGACTTGGCTCTATCGGGCGCAGGCCTCGCTCTCCTCGCTGCCCTCGCTGTCC
 TCGCTGCCCACGTGCACGCCTTGGCACCGCGCACCCAGATTGCCGAGGAATACG
 ATTTTGTGTCGTCGTTGGCGGGCGGCCAGGCTGGTCTCGTGATCGGAGCTCGTCTGTC
 GGAGATTGCAAATTATACAGTTCTCGTGCTGGAGGCAGGGACGAATGGAGACGA
 ATTTTCGAGAACGAATAGGCACGTACAACCTTTTATACTCCCGCATATTCCTACTAC
 GAGTCACTATGGACGACACCAATGAATTGGGCATACTATACTGTGCCTCAATCCC
 10 ATGCCGAGAATCGTCAAATTGAGTGGACCCGTTGGTAAGGGGCTGGGCGGAAGTT
 CTGCGATCAACGGATTGTACCTGACTCGCCCCGGTAAAGAGGAGATCAATGCAT
 GGAAAGACCTGCTAGGAGACATGGACGGGGCGGACAATTGGTCTGGGATTTCGT
 TCTATGCTGCAATGAAGAAGAGCGAGACTTTTACTCCCCCGTCAATGAGATTGC
 TACAGAAGGGAACATTACATGGGACCTTTCTACTCGTGGTATTCAGGGACCGATT
 15 CAGGCAACGTATCCCGGCTATACCTTCCCCCAAGTCGGCGAATGGGTCAATGTCTC
 TGGAAGCAATGGGCATTGCTAGTTCTAACGATATGTACGGTGGTGAGGTGTATG
 GCGCCGAAGTCTCGACGTCGAGTATCAATCCCACGAACTGGACACGCTCGTACA
 GCCCGACGGGATATCTCGACCCGCTCGCAGACAACGGCAATTACGACGTTGTGG
 CCGATGCGTTTGTACGCGCATTCTCTTTGATGCTTCTTCTCCGTCGAATAATCTG
 20 ACAGCAAACGGCGTGCAGTATACTCTTGACAACGGCAAGACAACTGCACGGTC
 AAGGTCAAGAAAGAGGTGATCTTATCAGCTGGGACGGTTGGCAGTCCTGCGGTA
 CTGCTCCACAGCGGTGTCGGTCCGAAAGATGTTCTTTCAGATGCTGGAGTTGAGC
 TGGTGTCTGAACTTCTGTTGTGGGTACCACCTCAGGATCATTTTAACAACAC
 25 CCTTTATCTCTCCTACATCGATTACGCCATCGCCTACATCAATCCACGCTGATGT
 ACGGCGATAATCTGGACGCACTACAGAAGAACATCACCACTCAAATCAACCAAT
 TCGTGCTGAACACGACTTACGATGCTGGTGTGTCATTGCAGGATACAAAGCAATTG
 AAATATGACCGCAACCACAATCCTCAGTAGTCTATCGGGCAAATTGAGCTCTTG
 30 TTCATGAATAGTGACTTAAACGGCGATATTGGTATCACTGCTGCTCTTCAACATC
 CTTACAGCCATGGACGCATATACATCAATTCCTCGAATCCGTTGGACTATCCCGT
 CATTGATCCGAATTATCTTGCTGTTTCTGCTGACTATGAAATCCTCCGCGACGGC
 CTCAATCTAGCCCCGCAACTCGGCAACACACAACCCCTAAGCAGCTGTCTAATA
 35 GCCGAAACAATCCCCGGTCCCAGCGTCAAACCCGACGACGACTGGCTTGAATGG
 ATCCGCGAAGCGACGGGGACAGAGTTCACCCTTCATCGTCCCTGTGCGATGCTA
 CCCCAGAGCAAGGCGGAGTAGTCGATGCCAACCTGCGCGTCTACGGTCTTGCC
 AATGTTTCGTGTTGCGGATGCCAGCGTTGTCCCATTTCATTGTGCGACGCATCTTAT
 40 GCGTTCGACGTATGGAGTCGCAGAACAGGCTAGTAATATCATTTCGTGCGCACTA
 CACGGATAGTAGGACTACAGGCACGAGTAGTTCGGATCCTGGCTCTGCGTCGTC
 ACCGACAAGCAGTGCATTGGGCGCTGAAGGGACTACTGGGGCGATTAGTGCTCA
 TACAGCGCCTTCTGGTGGTGTACGAAGCGTTTCTGCGGTATCCGCTTGGGTTGCT
 GTTGTGTTTCGCTGCAGCTGTTTCCATTTCCATTCTTGCATTGA (SEQ ID NO:15)

45
 50 MRLGSIGAGLALLAALAVLAHVHALAPRTQIAEEYDFVVVGGGQAGLVIGARLSEI
 ANYTVLVLEAGTNGDEFRRERIGTYNFYTPAYSYYESLWTTTPMNWAYYTVPQSHAE
 NRQIEWTRGKGLGGSSAINGLYLTRPGKEEINAWKDLLGDMGDADNWSWDSFYAA
 MKKSETFTPPSNEIATEGNITWDLSTRGIQGPQIATYPGYTFPQVGEWVMSLEAMGIA
 SSNDMYGGEVYGAEVSTSSINPTNWTRYSRTGYLDPLADNGNYDVVADAFVTRIL
 55 FDASSPSNLTANGVQYTLNKGKTNCTVKVKKEVILSAGTVGSPAVLLHSGVGPKD
 VLSDAGVELVSELPGVGHHLQDHFNNTLYLSYIDSAIAYINSTLMYGDNLDALQKNI
 TTQINQFVLNTTYDAGVIAGYKAIANMTATTILSSSIGQIELLFMNSDLNGDIGITAAL
 QHPYSHGRIYINSSNPLDYPVIDPNYLAVSADYEILRDGLNLRQLGNTQPLSSCLIAE
 TIPGPSVKTDWLEWIREATGTEFHPSSSCAMLPREQGGVVDANLRVYGLANVRV
 60 ADASVVPISLSTHLMASTYGVAEQASNIIRAHYTDSTRTTGTSSSDPGSASSPTSSALGA
 EGTGSAISAHTAPSGGVRVSAVSAWVAVVFAAAVSIFHSLH (SEQ ID NO:16)

65

EJEMPLO 1**CEPAS FÚNGICAS Y MÉTODOS**

5 Como se describe a continuación, se prepararon variantes de la cepa fúngica C1. Además, la mezcla enzimática de celulasa de *Trichoderma reesei* ("Turbo") usada en los siguientes ejemplos se produce por una cepa modificada para producir y secretar altos niveles de la beta-glucosidasa de TrCel3A, codificada por *bgl1* de *T. reesei*, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.015.703.

10 Cepas y nomenclatura

La cepa CF-400 ($\Delta cdh1$) es un derivado de la cepa C1 ("UV18#100f Δ apl Δ pyr5") modificada adicionalmente con una delección de *cdh1*, en la que *cdh1* comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 5. La cepa CF-401 ($\Delta cdh1\Delta cdh2$) es un derivado de la cepa C1 modificada adicionalmente con una delección de tanto *cdh1* como *cdh2*, en la que *cdh2* comprende la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 7. La cepa CF-402 (+*Bgl1*) es un derivado de la cepa C1 modificada adicionalmente para la expresión en exceso de una enzima beta-glucosidasa 1 (*Bgl1*) endógena. La cepa CF-403 es un derivado de la cepa C1 modificada con una delección de *cdh1* y modificada adicionalmente para expresar en exceso *bgl1*. La cepa CF-404 es un derivado de la cepa C1 adicionalmente modificada para expresar en exceso *bgl1* con una delección de tanto *cdh1* como *cdh2*.

20 Las enzimas celulolíticas de la cepa CF-400, CF-401, CF-402, CF-403 y CF-404, se produjeron por fermentación en cultivo líquido sumergido usando métodos muy conocidos en la técnica.

25 La celulosa Turbo de *T. reesei* se produjo por fermentación en cultivo líquido sumergido usando métodos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2010/0304438. El caldo de fermentación filtrado se desaló usando columnas Biospin (Biorad) siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de proteína total de la enzima desalada se ensayó usando un kit de BCA (Sigma) con un control de albúmina de suero bovino (Sigma).

30 Condiciones de la reacción de hidrólisis

Se pretrató paja de trigo ("WS") usando los métodos descritos en la patente de EE.UU. 4.461.648. Tras el pretratamiento se añadió benzoato de sodio a una concentración del 0,5 % como conservante. El material pretratado se lavó entonces con seis volúmenes de agua de grifo templada (~35 °C) usando un embudo Buchner y papel de filtro para producir el sustrato para las posteriores reacciones de hidrólisis ("WS pretratada").

35 La porción celulósica de la WS pretratada se hidrolizó usando los sistemas de enzima celulolíticos obtenidos como se ha descrito anteriormente. La WS pretratada se hidrolizó con 30 mg de celulasa por g de celulosa en reacciones con 50 g/l celulosa a 50 °C y pH 5,0, con 250 rpm de agitación orbital, en volúmenes de reacción totales de 50 ml, a menos que se especificara. Para las reacciones de hidrólisis que contienen las mezclas enzimáticas de celulasa producidas por las cepas C1 CF-400 y CF-401, la beta-glucosidasa purificada de celulasas Turbo o CF-402 se añadió a una dosis de 125 UI por gm de celulosa.

40 Detección del rendimiento de glucosa en la reacción de hidrólisis

45 En esta reacción, alícuotas de mezcla de reacción de 1 ml se muestrearon periódicamente de matraces de reacción. Cada reacción se mezcló bien durante el muestreo para evitar eliminar una cantidad desproporcionada de sólido o sobrenadante. La reacción se detuvo incubando la alícuota en un bloque térmico a 100 °C durante al menos 5 minutos. Los sobrenadantes de cada reacción se analizaron para la concentración de glucosa para determinar el grado de conversión. El cálculo de la conversión incluyó términos de corrección para el efecto de la glucosa sobre la densidad de la disolución y el efecto del volumen de exclusión de lignina no hidrolizable presente en la reacción. La concentración de glucosa se determinó usando un ensayo enzimático acoplado basado en glucosa oxidasa y peroxidasas de rábano picante usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Trinder, Ann. Clin. Biochem., 6:24-27 [1969]).

50 Detección de la conversión de celulosa

55 Se recuperaron sólidos residuales de cada una de las reacciones de 50 ml, se lavaron y se analizaron por espectroscopía infrarroja. Las alícuotas de las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min en una microcentrífuga Eppendorf para sedimentar los sólidos, el sobrenadante se decantó y los sólidos se resuspendieron de nuevo al volumen original en agua. Este procedimiento se repitió 5 veces. Los sólidos lavados se dispusieron sobre el cristal de detección de una celda Golden Gate ATR instalada sobre un espectrómetro de infrarrojos Bruker Vertex 70 y se midió la absorbancia entre 500-4000 cm^{-1} .

60 **EJEMPLO 2****PURIFICACIÓN DE CDH1 DE C1**

65

Primero, se concentraron 400 ml de sobrenadante de C1 a 140 ml usando un evaporador rotatorio. A continuación, 63 ml del concentrado se intercambiaron de tampón a tampón MOPS 20 mM a pH 7,0 usando 4 columnas de desalación Hi-Prep 26/10 en línea (GE Healthcare, 17-5087-02). El sobrenadante de tampón intercambiado resultante (~150 g/l de proteína total) se cargó sobre una columna que contenía 500 ml de resina DEAE Fast Flow (GE Healthcare, 17-0709-01) pre-equilibrada con tampón MOPS 20 mM a pH 7,0. La columna se aclaró con 1 volumen de columna (VC) de MOPS 20 mM (pH 7,0) y a continuación se ejecutó un gradiente de cloruro sódico 0-300 mM durante 12 volúmenes de columna. Las fracciones se recogieron y se analizaron por geles de Bis-tris SDS-PAGE NuPage® Novex® (Invitrogen, NP0322BOX). Las bandas de SDS-PAGE correspondientes al peso molecular aparente de CDH1 se analizaron por EM (realizado por Alphalyse). El análisis de mapeo de masa confirma la presencia de CDH1 en fracciones de elución tardía. Las fracciones que contienen CDH1, como se demuestra por gel de SDS-PAGE, y se confirmó por EM, se reunieron y se concentraron por ultrafiltración usando filtro centrífugo de 10 kDa de Sartorius (Sartorius-Stedim, VS2002). A continuación, se añadieron 10 ml de piperazina 500 mM (pH 5,6) y 45 ml de sulfato de amonio saturado a 45 ml del conjunto que contenía CDH1 y la mezcla resultante se cargó sobre una columna Phenyl FF (high sub) 16/10 (GE Healthcare, 28-9365-45) pre-equilibrada con sulfato de amonio 1,6 M en piperazina 50 mM, pH 5,6. Se ejecutó un gradiente de sulfato de amonio 1,6 M a 0 M en piperazina 50 mM, pH 5,6, sobre 30 VC. Las fracciones se recogieron y se realizó análisis en gel de SDS-PAGE sobre las fracciones seleccionadas como se ha descrito anteriormente, revelando que CDH1 se eluyó en la etapa de aclarado final con aproximadamente el 80-90 % de pureza.

Se midió la actividad de CDH1 usando un ensayo de reducción con DCPIP (2,6-diclorofenolindifenol) similar al descrito por Schou et. al. (Schou et al., Biochem J., 330:565-71 [1998]). Brevemente, en una placa de 96 pocillos de fondo plano transparente a UV, 50 µL de fracciones que contenían CDH1 se añadieron a 150 µL de una disolución de 1,0 g/l de celobiosa y DCPIP 100 µM en acetato sódico 100 mM, pH 5,0. Las muestras se agitaron brevemente a temperatura ambiente y a continuación se midió la absorbancia a 530 nm (A_{530}) durante 10 minutos. Las fracciones que contenían CDH1 de C1 mostraron una rápida caída en la absorbancia a 530 nm. Los ensayos de DCPIP se realizaron usando cantidades variables de glucosa o celobiosa con CDH1 purificada. Se prepararon diluciones sucesivas de celobiosa (1,0 g/l a 7,8 mg/l) y glucosa (10 g/l a 78 mg/l) en una placa de pocillos poco profundos de 96 pocillos. Se añadieron 20 µL de patrones de glucosa y de celobiosa a 160 µL/pocillo de DCPIP 200 mM (en acetato sódico 100 mM a pH 5,0). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 20 µL de disolución de CDH1. La absorbancia a 530 nm se monitorizó durante 30 minutos. Las comparaciones de las tasas de disminución en la absorbancia a 530 nm indican que CDH1 de C1 es aproximadamente 10 veces más activo sobre la celobiosa que la glucosa.

EJEMPLO 3

PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE DELECCIÓN DE MARCADOR DE FRACCIONAMIENTO DE *CDH1*

Se aisló ADN genómico de la cepa C1 usando procedimientos convencionales. Brevemente, se sembró inóculo de hifa en un medio de crecimiento y se dejó crecer durante 72 horas a 35 °C. Se recogieron alfombras miceliales por centrifugación, se lavaron y se añadieron 50 µL de tampón de extracción de ADN (Tris 200 mM, pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 125 mM; 0,5 % de SDS). Los micelios se molieron con molinillo cónico, se re-extrajeron con 250 µL de tampón de extracción, y la suspensión se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 300 µL de isopropanol. El ADN se recogió por centrifugación, se lavó dos veces con 70 % de etanol y se diluyó en 100 µL de agua.

Se clonaron los fragmentos de ADN genómico que flanquean el gen *cdh1* usando los cebadores cf09067 y cf09068 (homología en la dirección 5' de *cdh1*) y cebadores cf09069 y cf09070 (homología en la dirección 3' de *cdh1*). Las reacciones de PCR se realizaron usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos (para homología en la dirección 5') o 53 °C durante 30 segundos (para homología en la dirección 3') y 72 °C durante 1 minuto, y seguido de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. El gen *pyr5* se amplificó por PCR como un marcador interrumpido de un vector usando los cebadores cf09024 y cf09025 (para la porción 5' del gen) y cf09026 y cf09027 (para la porción 3' del gen). Las reacciones de PCR se realizaron usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto, seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los cebadores se muestran en la Tabla 3-1. En reacciones de extensión por solapamiento de hebras separadas (Horton et al., Meth. Enzymol., 217:270-279 [1993]), los productos de PCR resultantes de los cebadores cf09067 y cf09068 y los cebadores cf09026 y cf09027 se fusionaron como si fueran los productos de PCR resultantes de los cebadores cf09069 y cf09070 y los cebadores cf09024 y cf09025. Las reacciones de PCR se realizaron usando ADN polimerasas Phusion® de Finnzymes siguiendo las instrucciones del fabricante que incluyen 3 % de DMSO y usando 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 98 °C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 62 °C durante 20 segundos, 72 °C durante 2 minutos, y seguido de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de extensión por solapamiento de hebras se usaron para la delección de *cdh1*.

Tabla 3-1. Secuencias de imprimación	
Nombre de imprimación	Secuencia (5'-3')
cf09067	CACGCGGGGTTCTTTCTCCATCTC (SEQ ID NO:17)
cf09068	TGAGGAAAACGCCGAGACTGAGCTCGACTCTGCCGGCCT ACCTACGA (SEQ ID NO:18)
cf09069	ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTTTGATGGGGAGTTGA GTTTGTGAA (SEQ ID NO:19)
cf09070	GGATGGATGAGGTTGTTTTGAGC (SEQ ID NO:20)
cf09024	AACCCACTCGTGCACCCAAGTAT (SEQ ID NO:21)
cf09025	GACCACGATGCCGGCTACGATACC (SEQ ID NO:22)
cf09026	ACATGGCCCCACTCGCTTCTTACA (SEQ ID NO:23)

EJEMPLO 4

MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN

Se inocularon células C1 y cepas derivadas en 100 ml de medio de crecimiento en un matraz Erlenmeyer de 500 ml usando 10^6 esporas/mL. El cultivo se incubó durante 48 horas a 35 °C, 250 rpm. Para recoger los micelios, el cultivo se filtró sobre un filtro estéril Myracloth (Calbiochem) y se lavó con 100 ml de disolución 1700 mM de NaCl/CaCl₂ (NaCl 0,6 M, CaCl₂*H₂O 0,27 M). Los micelios lavados se transfirieron a un tubo de 50 ml y se pesaron. Se disolvió Caylase (20 mg/gramo de micelios) en NaCl/CaCl₂ 1700 mM y se esterilizó por UV durante 90 s. A continuación se añadieron 3 ml de disolución de Caylase estéril en el tubo que contiene micelios lavados y se mezclaron. A continuación se añadieron 15 ml de disolución 1700 mM de NaCl/CaCl₂ al tubo y se mezclaron. La suspensión de micelio/Caylase se incubó a 30 °C, 70 rpm, durante 2 horas. Se recogieron protoplastos filtrando a través de un filtro Myracloth estéril en un tubo de 50 ml estéril. Se añadieron 25 ml de STC frío (sorbitol 1,2 M, CaCl₂*H₂O 50 mM, NaCl 35 mM, Tris-HCl 10 mM) al flujo a través y se centrifugó a 2720 rpm (1500xg) durante 10 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió en 50 ml de STC y se centrifugó de nuevo. Después de las etapas de lavado el sedimento se resuspendió en 1 ml de STC.

En el fondo de un tubo estéril de 15 ml se pipetearon 2 µg de ADN de cada producto de extensión por solapamiento de hebras *pyr5::Δcdh1* y se añadieron 1 µL de ácido aurintricarboxílico y 100 µL de protoplastos. El contenido se mezcló y los protoplastos con el ADN se incubaron a temperatura ambiente durante 25 min. Se añadieron 1,7 ml de disolución de PEG4000 (60 % de PEG4000 (polietilenglicol, peso molecular promedio 4000 daltons), CaCl₂*H₂O 50 mM, NaCl 35 mM, Tris-HCl 10 mM) y se mezclaron minuciosamente. La disolución se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min. El tubo se llenó con STC, se mezcló y se centrifugó a 2500 rpm (1250 xg) durante 10 min a 4 °C. El STC se escurrió y el sedimento se resuspendió en el STC restante y se sembró sobre placas de medio selectivo mínimo, que carecían de uracilo, pero que contenían sacarosa 0,67 M como estabilizador osmótico. Las placas se incubaron durante 5 días a 35 °C. Las colonias volvieron a cultivarse en línea y se comprobaron para la deleción de *cdh1*, designada la cepa "CF-400".

EJEMPLO 5

CONFIRMACIÓN DE LA DELECIÓN DE CDH1

Se preparó ADN genómico como se describe en el Ejemplo 3. Se usaron pares de cebadores cf09112 y cf09113 (las reacciones de PCR se realizaron usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 µM de cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos, y seguido de extensión final a 72 °C durante 5 minutos), además de cf09110 y cf09111 (las reacciones se realizaron usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2', seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30", 55,4 °C durante 30", 72 °C durante 30", y seguido de extensión final a 72 °C durante 5') en reacciones de PCR separadas para confirmar la ausencia del gen *cdh1*. Los cebadores cf09181 y cf09091 se usaron en PCR para confirmar la apropiada estructura de empalme y direccionamiento de la construcción de marcador de *pyr5* (véase la Tabla 5-1). La reacción de PCR se realizó usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 54,4 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 3 minutos 30 segundos, y seguido de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se ejecutaron sobre gel de agarosa para confirmar un patrón de bandejo indicativo de deleción de *cdh1*.

Tabla 5-1. Secuencias de imprimación	
Nombre de imprimación	Secuencia (5'-3')
cf09110	AAGCGTGCCGATTTTCCTGATTTC (SEQ ID NO:24)
cf09111	GCATTTCTGGGGCGGTTAGCA (SEQ ID NO:25)
cf09112	TCATCGACGCCTCCATCTTCC (SEQ ID NO:26)
cf09113	TTTCGGTTGTCGTGTTCCATTAT (SEQ ID NO:27)
cf09181	GGAGATCCTGGAGGATTTC (SEQ ID NO:28)
cf09091	CAGGCGGTGTGCGTTATCAAAA (SEQ ID NO:29)

Se usó un ensayo colorimétrico de diclorofenolindofenol (DCPIP) para probar la delección de *cdh1* en CF-400. La delección de *cdh1* se determinó por la disminuida capacidad para reducir el sustrato de DCPIP en comparación con una mezcla enzimática de celulasa (o filtrado de cultivo) producida por la cepa parental. Se cultivaron las células de la cepa C1 parental y la cepa de delección de *cdh1* putativa y el sobrenadante se probó para la actividad de DCPIP. En placas de microtitulación se combinaron 160 μ L de disolución de reactivo DCPIP recién preparada (DCPIP 0,2 mM en acetato sódico 100 mM, pH 5,0), 20 μ L de disolución de celobiosa (1 g/l de celobiosa en agua desionizada) y 20 ml de sobrenadante de células sin diluir. La absorbancia de la disolución se midió inmediatamente con el tiempo a 530 nm en modo cinético durante 30 minutos para rastrear la pérdida de absorbancia como resultado de la reducción de DCPIP. El sobrenadante de las cepas que muestran disminuida capacidad para reducir el sustrato de DCPIP se ejecutó sobre SDS-PAGE para confirmar la ausencia de CDH1.

Las proteínas de sobrenadantes de cultivo de fermentaciones en cultivo líquido sumergido de CF-400 y las parentales sin transformar se separaron por SDS-PAGE usando protocolos convencionales. Las proteínas se visualizaron por tinción con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. La proteína Cdh1 se observó como una banda de ~90 kD en la parental sin transformar, pero estuvo ausente en CF-400.

EJEMPLO 6

DELECCIÓN DE CDH2

Se aisló ADN genómico como se describe en el Ejemplo 3. Se clonaron los fragmentos de ADN genómico que flanquean el gen *cdh2* usando los cebadores cf10340 y cf10341 (homología en la dirección 5' de *cdh2*) y los cebadores cf10342 y cf10343 (homología en la dirección 3' de *cdh2*). Las reacciones de PCR se realizaron usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 μ M de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos (para homología en la dirección 5') o 58,4 °C durante 30 segundos (para homología en la dirección 3'), 72 °C durante 1 minuto, y seguido de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. El gen de higromicina se amplificó por PCR como un marcador interrumpido de un vector usando los cebadores cf10176 y cf10177 (para la región 5' del gen) y cf10178 y cf10179 (para la región 3' del gen). Se realizaron reacciones de PCR usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 μ M de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 56,3 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto 30 segundos, y seguido de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los cebadores se muestran en la Tabla 5. En reacciones de extensión por solapamiento de hebras separadas (Ejemplo 3), los productos de PCR resultantes de los cebadores cf10340 y cf10341 y los cebadores cf10178 y cf10179 se fusionaron como si fueran los productos de PCR resultantes de los cebadores cf10342 y cf10343 y los cebadores cf10176 y cf10177. Las reacciones de PCR se realizaron usando ADN polimerasas Phusion® (Finnzymes) siguiendo las instrucciones del fabricante y que incluyen 3 % de DMSO y 0,2 μ M de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 98 °C 1 minuto, 35 ciclos de 98 °C 10 segundos, 62 °C 20 segundos, 72 °C 2 minutos y extensión final a 72 °C 5 minutos. Los productos de extensión por solapamiento de hebras se usaron para la delección de *cdh2*.

Tabla 5-1. Secuencias de imprimación	
Nombre de imprimación	Secuencia (5'-3')
cf10340	TTCAGCACGGCCGGGATTTTATCCA (SEQ ID NO:30)
cf10341	GTAACACCCAATACGCCGGCCGAACATAAGAGCGGAGGTCAG GAATAA (SEQ ID NO:31)
cf10342	CCGTC'TCTCCGCATGCCAGAAAGAGCTGTCAACGCTGGTITGT GGTGG (SEQ ID NO:32)
cf10343	AATGCCGGACCGCGAGTTCAGGTA (SEQ ID NO:33)
cf10176	TCTTTCTGGCATGCCGAGAGACGG (SEQ ID NO:34)
cf10177	TGTTGGCGACCTCGTATTGGGAAT (SEQ ID NO:35)
cf10178	TCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTG (SEQ ID NO:36)
cf10179	TTCGGCCGGCGTATTGGGTGTAC (SEQ ID NO:37)

Se cultivaron células de la cepa CF-401 y se transformaron como se describe en el Ejemplo 4. Las colonias transformadas de CF-401 volvieron a cultivarse en línea y se comprobaron para la delección de *cdh2*.

Se preparó ADN genómico como se describe en el Ejemplo 3. La delección de *cdh2* en CF-401 se confirmó por PCR. Se usaron los cebadores cf10326 y cf10327 en PCR para confirmar la ausencia del gen *cdh2*. La reacción de PCR se realizó usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 59,3 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos y seguido de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los cebadores cf10364 y cf10295 se usaron en PCR para confirmar la apropiada estructura de empalme y direccionamiento de la construcción de marcador de higromicina (Tabla 6-2). La reacción de PCR se realizó usando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante usando 0,2 µM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C 2 minutos, 35 ciclos de 95 °C 30 segundos, 56 °C 30 segundos, 72 °C 3 minutos y extensión final a 72 °C 5 minutos. Los productos de PCR se ejecutaron sobre gel de agarosa para confirmar un patrón de bandeo indicativo de delección de *cdh2*. Se realizaron ensayo de diclorofenolindofenol (DCPIP) y confirmación por SDS-PAGE de la delección de *cdh2* como se describe en el Ejemplo 5. La delección de *cdh2* de la cepa CF-401 se determinó por la disminuida capacidad del filtrado de cultivo resultante (o mezcla enzimática de celulasa) para reducir el sustrato de DCPIP en comparación con el producido por la cepa CF-400 parental.

Tabla 6-2. Secuencias de imprimación	
Nombre de imprimación	Secuencia (5'-3')
cf10326	GCGCTGAAAAGGATGCCACCGAGT (SEQ ID NO:38)
cf10327	GCACCCACTGTCCGAAACCGTTA (SEQ ID NO:39)
cf10295	AGCGCGTCTGCTGCTCCATACAAG (SEQ ID NO:40)
cf10364	CAAAGCCACGTCCAGTTGATAGA (SEQ ID NO:41)

EJEMPLO 7

HIDRÓLISIS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA POR UNA MEZCLA ENZIMÁTICA QUE CARECE DE CDH1

Se comparó la capacidad de las mezclas enzimáticas de CF-402 y CF-403 para sacarificar la celulosa presente en paja de trigo (WS) pretratada como se mide por la producción de glucosa y gluconato en un ensayo de hidrólisis como se describe en el Ejemplo 1. Cada mezcla enzimática se evaluó usando tanto una única dosis de enzima de 30 mg de enzima/g de celulosa como en paralelo usando una segunda dosis de 30 mg de enzima/g de celulosa añadida después de una hidrólisis de 24 hr a la carga de enzima original de 30 mg/g. La preparación de WS pretratada usada en estos experimentos tuvo una convertibilidad máxima del 95 %; se normalizaron las conversiones de todas las enzimas. Los resultados del ensayo de hidrólisis se representan en la Fig. 1.

En el experimento de dosis única, los productos solubles totales medidos son iguales a una conversión de celulosa del 79 % y 87 % del rendimiento máximo teórico de glucosa con mezclas enzimáticas de CF-402 y CF-403, respectivamente. Se midió que aproximadamente el 5 % de los productos solubles era gluconato para CF-403 en comparación con 10 % para CF-402. Los resultados demuestran que eliminar la enzima CDH1 de la mezcla de celulosa producida por cepas derivadas de C1 mejora el rendimiento de la glucosa.

En los experimentos de multidosis, los productos solubles totales medidos con mezclas enzimáticas de CF-402 indicaron una conversión del 90 % de celulosa en comparación con el 95 % con mezclas enzimáticas de CF-403. La conversión de glucosa a gluconato fue mayor para CF-402 (14 %) en comparación con CF-403 (7 %).

5 EJEMPLO 8

HIDRÓLISIS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA POR UNA MEZCLA ENZIMÁTICA QUE CARECE DE TANTO CDH1 COMO CDH2

10 Se comparó la capacidad de mezclas enzimáticas para sacarificar la celulosa presente en WS pretratada para mezclas enzimáticas obtenidas de CF-401, CF-400 y CF-402 en el siguiente ensayo de hidrólisis.

15 Se produjeron mezclas enzimáticas derivadas de CF-400, CF-401 y CF-402 por fermentación como se describe en el Ejemplo 1. Las mezclas enzimáticas derivadas de CF-400, CF-401 y CF-402 se añadieron a la paja de trigo pretratada a carga de enzima del 3,83-6 % con respecto a celulosa. La concentración de celulosa fue 110 g/l de beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* (ANBG, Sigma) a una carga de enzima del 2 % con respecto a celulosa, se complementó con mezclas enzimáticas de CF-400 y CF-401 ya que estas cepas carecen de actividad de beta-glucosidasa añadida. Se compararon los rendimientos de glucosa y gluconato para la extracción de muestra a las 20 48-70 h.

25 Para el análisis de glucosa, las muestras se diluyeron 1:10 usando N_2SO_4 10 mM y a continuación se analizaron usando un Agilent HPLC 1200 equipado con columna de exclusión de iones HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) con N_2SO_4 5 mM como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,6 ml/min a 65 °C. El tiempo de retención de la glucosa fue 9,1 minutos. El análisis de gluconato se llevó a cabo usando CL-EM. La EM/CL/EM usada fue un sistema de 30 cuadrupolo triple API2000 (AB Sciex) equipado con Agilent 1100 HPLC e inyector automático CTC PAL. La columna usada fue una HYPERCARB 50 X 2,1 mm, 3 μ m a 80 °C de temperatura. El método de cromatografía fue una serie isocrática de 2 minutos (95 % de A) con una velocidad de flujo de 350 μ L/min. Las dos fases móviles contuvieron 1,5 % de NH_4OH . La fase móvil A fue acuosa y la fase B fue una disolución 50:50 de CH_3CN : IPA. La transición de EM/EM monitorizada para gluconato fue 194,99/161,10. Los métodos y controles analíticos para medir el gluconato y la glucosa fueron ligeramente diferentes para CF-402. Sin embargo, los métodos y controles usados son muy conocidos en la técnica.

Los resultados se proporcionan en la Fig. 2 y en la Tabla 7-1 a continuación.

35

Tabla 7.1. Conversión de Glucosa			
Mezcla de encimas	Conversión Fraccional de Celulosa Disponible		
	Glucosa	Gluconato	Suma
<i>BglI</i> (CF-402)	0.800	0.167	0.967
$\Delta cdh1$ (CF-400)	0.861	0.114	0.974
$\Delta cdh1 \Delta cdh2$ (CF-401)	0.954	0.024	0.978

40

45 Los resultados de los experimentos muestran que los productos solubles totales obtenidos de las mezclas enzimáticas derivadas de las cepas CF-400, CF-401 y CF-402 fueron similares. Sin embargo, las relaciones de glucosa:gluconato fueron diferentes en los productos solubles producidos por las mezclas enzimáticas de las diferentes cepas. Las mezclas enzimáticas derivadas de CF-402 produjeron aproximadamente 23 g/l de gluconato. En comparación, las mezclas enzimáticas derivadas de CF-400 (la delección del gen *cdh1*) redujeron la producción de gluconato a aproximadamente 16 g/l. La mezcla enzimática resultante de la delección adicional del gen *cdh2* en CF-401 redujo significativamente (3,3 g/l) la producción de gluconato. Esta reducción en la producción de gluconato representó un 86 % de la reducción en comparación con las mezclas enzimáticas derivadas de la cepa CF-402. Correspondientemente, el rendimiento de glucosa aumentó de 112 g/l con CF-402 a 133,6 g/l con mezclas enzimáticas derivadas de CF-401. Los resultados demuestran que la eliminación de enzimas CDH1 y CDH2 por delección de tanto los genes *cdh1* como *cdh2* aumenta significativamente el rendimiento de glucosa con una 55 disminución concomitante en la producción de gluconato en la reacción de sacarificación.

EJEMPLO 9

60 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELULOSA

La porción celulósica de WS pretratada se hidrolizó según los métodos descritos en el Ejemplo 1 usando la mezcla enzimática derivada de CF-402. En cada reacción, se dejó reaccionar una dosis inicial de 30 mg/g de CF-402 con el sustrato de WS pretratada. Después de 24 horas, se añadió una dosis adicional de 30 mg/g de mezcla enzimática de 65 CF-402 a un matraz de reacción.

Se muestrearon alícuotas de 1 ml periódicamente de todos estos matraces, y las concentraciones de glucosa se determinaron usando un ensayo enzimático acoplado como se describe en el Ejemplo 1. Por rendimiento de glucosa, una dosis única de 30 mg/g de la mezcla enzimática de CF-402 produce 69,5 % del rendimiento máximo teórico de glucosa (G_{máx}). La dosificación de CF-402 adicional aumentó este rendimiento al 75,6 % como se muestra en la Fig. 11.

EJEMPLO 10

CONVERSIÓN DE GLUCOSA POR MEZCLAS ENZIMÁTICAS DERIVADAS DE C1

Se mezclaron cincuenta y dos mg de la mezcla enzimática de CF-402 derivada de C1 o la mezcla enzimática "Turbo" de *T. reesei* con una disolución que contenía tanto 50 % en peso/peso de glucosa como 5 % en peso/peso de celobiosa o una disolución que contenía 50 % en peso/peso de glucosa sola, a pH 5,0 y 60 °C durante 24 hr y 48 hr.

Se produjo una especie desconocida (detectada en cromatogramas de HPLC como se describe en más detalle en el presente documento) de una manera dependiente del tiempo en estas reacciones (Tabla 2). Las áreas pico de la especie desconocida se normalizaron al área pico de la especie desconocida en la reacción de 24 hr de la mezcla enzimática de CF-402 y glucosa sola. Estos datos indican que el sustrato de celulosa insoluble, que principalmente comprende celulosa y lignina, no necesita estar presente para la formación de esta especie. La presencia de glucosa sola fue suficiente para la formación de la especie, aunque la producción de la especie se potenció mediante la adición de celobiosa.

Tabla 10-1. Producción de un compuesto desconocido por mezcla de encimas

[Glucosa] (w/w)	[Celobiosa] (w/w)	Encima	área del pico del desconocido (normalizado)	
			24h	48h
50%	-	Turbo	0.08	0.09
		CF-402	1.00	1.44
	5%	Turbo	0.13	0.14
		CF-402	1.32	1.70

EJEMPLO 11

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DE CELULOSA USANDO HIDRÓLISIS CON ÁCIDO CONCENTRADO

La especie desconocida observada en el Ejemplo 10 se sometió a condiciones ácidas conocidas por hidrolizar oligosacáridos para probar si representaba un oligómero de glucosa. Un oligómero de glucosa tal podría estar presente tanto como un producto directo de la hidrólisis de celulosa como de la reacción de síntesis de los productos directos mediante una reacción tal como transglucosilación. Se usó celotriosa, un trímero de beta 1-4 de glucosa, como control positivo. Se realizó hidrólisis con ácido mezclando un volumen igual de una muestra y 98 % de ácido sulfúrico. La hidrólisis con ácido anuló completamente el pico de celotriosa en un cromatograma de HPLC recogido usando el método descrito en el presente documento (Fig. 12A), pero no alteró significativamente el área pico de la especie desconocida, aunque tuvo un menor efecto sobre su tiempo de retención (Fig. 12B). Estos resultados indican que la especie desconocida no es un oligómero de glucosa.

EJEMPLO 12

ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA (IR) DE HIDROLIZADO LIGNOCELULÓSICO

Se usó espectroscopía de IR para analizar el hidrolizado de reacciones con paja de trigo pretratada en el Ejemplo 11. Los hidrolizados se seleccionaron de reacciones que habían alcanzado su punto final (es decir, no se observó formación de glucosa adicional). El hidrolizado se aplicó gota a gota al cristal de detección de ATR de un espectrómetro de infrarrojos Bruker Vertex 70, y se dejó evaporar cada gota para formar una película colada. No se observó un pico a un número de onda de 1715 cm⁻¹ en el espectro de hidrolizado de CF-402 en el hidrolizado de Turbo (Fig. 13). Este número de onda está asociado con un modo vibracional de un grupo carbonilo. Conjuntamente con otras observaciones descritas en el presente documento de que la especie desconocida puede producirse por la mezcla enzimática de CF-402 a partir de glucosa sola, esto indica que la especie desconocida es una forma oxidada de la glucosa.

EJEMPLO 13

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUCONO-LACTONA EN HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE

CELULOSA

Hay tres formas de glucosa oxidada: ácido glucónico formado por oxidación en el carbono 1, ácido glucurónico formado por oxidación en el carbono 6 y ácido glucárico que se oxida en los carbonos 1 y 6. El ácido glucónico existe en equilibrio dependiente del pH con su forma de lactona (gluconolactona o 1,5-gluconolactona, o D-glucono-1,5-lactona) producida mediante esterificación. Se realizó cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) para caracterizar estos compuestos en hidrolizados enzimáticos de celulosa.

Se analizaron ácido glucurónico, ácido glucárico y la forma de lactona del ácido glucónico por HPLC de intercambio aniónico. El sistema de HPLC fue un sistema de cromatografía modular Dionex DX-500 que consiste en una bomba de gradiente GP50, una válvula de muestreo de seis puertos Rheodyne (Idex), un inyector automático AS40, un detector electroquímico ED40 o ED50 con un electrodo de trabajo de oro y electrodo de referencia de Ag/AgCl para la detección amperométrica pulsada (PAD). La columna CarboPac™ PA1 (4 x 250 mm; Dionex) y la precolumna (4 x 50 mm) consisten en un sustrato de poliestireno/divinilbenceno de 10 µm de diámetro aglomerado con 580 nm de látex funcionalizado con amonio cuaternario MicroBead (2 % de enlace cruzado; MicroBeads).

Las muestras de ácido glucurónico, ácido glucárico y gluconolactona se diluyeron en agua para llevarlas dentro del intervalo de los patrones (0,003 - 0,030 g/l) y se inyectaron en un volumen de 25 µL. Las muestras se sometieron a una separación isocrática en una disolución de NaOH 6 mM durante 28 minutos después de la inyección. Entonces se aplicó un gradiente de 6 minutos, elevando la concentración de NaOH linealmente de 10 mM a 300 mM. A continuación se aplicó un gradiente de 5 minutos, elevando la concentración de NaOH linealmente de 300 mM a 1 M. A continuación la columna se reequilibró con NaOH 6 mM antes de la siguiente serie. La integración de picos y la cuantificación de patrones y desconocidos se realizó con el software CHROMELEON® (Dionex).

Se mezcló glucosa con una mezcla enzimática secretada recogida de CF-402. Específicamente, se mezclaron cincuenta y dos mg de la mezcla enzimática de CF-402 con una disolución que contenía tanto 50 % en peso/peso de glucosa, a pH 5,0 y 60 °C durante 24 hr y 48 hr. El producto de esta reacción se analizó usando las condiciones de HPLC anteriores. Un componente del producto de esta reacción se co-eluyó con tanto ácido glucárico como gluconolactona (Fig. 14A).

Se usó un segundo método de HPLC para analizar el ácido glucárico, la lactona de ácido glucónico y el producto de la reacción de glucosa con la mezcla enzimática secretada recogida de CF-402. Este método emplea una columna IonPac®AS11-HC (4 x 250 mm; Dionex) y precolumna AG11-HC (4 x 50 mm) que consiste en un polímero de etilvinilbenceno de 9 µm de diámetro reticulado con 55 % de polímero de divinilbenceno aglomerado con un látex de amonio cuaternario de alcano de 70 nm (6 % de enlace cruzado de látex) y una capacidad de 290 µeq/columna (4 x 250 mm). El sistema de HPLC usado para este método comprendió una bomba de gradiente dual (DP) con desgasificación a vacío, válvulas de muestreo de seis puertos duales Rheodyne (Idex) y un inyector automático AS con válvula desviadora. El sistema se equipó con tanto detectores electroquímicos como de conductividad. Se instaló una columna trampa de aniones (ATC) en línea entre la bomba en serie y la válvula de inyección DC para eliminar cualquier especie aniónica en el eluyente y un dispositivo de eliminación de carbonato que se instaló entre el supresor químico y el detector de conductividad para eliminar parcialmente cualquier carbonato en la fase móvil.

Las muestras de ácido glucárico, lactona de ácido glucónico y el producto de la reacción de glucosa con la mezcla enzimática secretada recogida de CF-402 se diluyeron en agua para llevarlas dentro de intervalo de los patrones (0,003 - 0,030 g/l) y se inyectaron en un volumen de 25 µL. Las muestras se sometieron a una separación isocrática en una disolución de NaOH 1 mM durante 6 minutos después de la inyección. A continuación se aplicó un gradiente de seis minutos, elevando la concentración de NaOH linealmente de 1 mM a 60 mM. La columna se limpió posteriormente con una etapa de NaOH 1 M corta antes del re-equilibrio en NaOH 1 mM. La integración de picos y la cuantificación de patrones y desconocidos se realizó con el software CHROMELEON® (Dionex).

Usando este segundo método de HPLC, la gluconolactona, pero no el ácido glucárico, co-eluye con un componente del producto de la reacción de glucosa con la mezcla enzimática secretada recogida de CF-402 (Fig. 14B). Por tanto, la especie desconocida es gluconolactona, que se produce por la acción de una o más enzimas dentro del sistema de enzimas de C-1.

EJEMPLO 14**DISMINUCIÓN EN EL RENDIMIENTO DE GLUCOSA DE LA HIDRÓLISIS DE CELULOSA EN PRESENCIA DE OXIDORREDUCTASAS**

Se pretrató paja de trigo y se lavó como se describe en el Ejemplo 1. La celulosa en este material pretratado se hidrolizó por 30 mg de celulasa Turbo de *T. reesei* por gramo de celulosa. La reacción se realizó a 50 °C y pH 5,0, con 250 rpm de agitación orbital.

Se añadieron enzimas del grupo E.C. 1 de enzimas, las oxidorreductasas, al hidrolizado de esta reacción en reacciones separadas. Se probaron glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (E.C. 1.1.3.4), piranosa oxidasa de

Coriolus sp. (E.C. 10.1.3.10) y glucosa deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp. (10.1.1.47), todas compradas de Sigma-Aldrich. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo durante 72 h al óptimo de pH y temperatura de cada enzima: pH 8,0 y 37 °C para glucosa oxidasa y glucosa deshidrogenasa; pH 7,0 y 37 °C para piranosa oxidasa. Para la glucosa deshidrogenasa se añadió un suplemento de un equivalente (con respecto a glucosa) de beta-nicotinamida adenina dinucleótido hidratado (Sigma) a la mezcla de reacción. Las enzimas se dosificaron a 0,45 mg por gramo de celulosa de partida. Esta dosis se corresponde con 1,5 % de la dosis completa de 30 mg/g, simulando la presencia de una enzima oxidativa de baja abundancia en un sistema de enzimas mixto. Las concentraciones de glucosa se determinaron en cada matraz de reacción y en controles no de enzima por HPLC (Dionex ICS5000 con una columna CarboPac™ PA1, 4 x 250 mm (Dionex), con un eluyente de 6 % de NaOH 200 mM en ddH₂O desgasificada, tiempo de ejecución de 25 minutos a una tasa de 1,5 ml/min en la que el tiempo de retención de glucosa es 11,2 minutos) para determinar la pérdida de rendimiento de glucosa. Se determinaron los valores de p a partir de una estadística de la *t* calculada para el caso de tamaños de muestra desiguales y varianzas iguales; hubo de dos a cuatro matraces de enzima más y una a dos sin enzima.

Encima	Pérdida del rendimiento de glucosa	Valor- P
Glucosa oxidasa	4.38%	<0.01
Piranosa oxidasa	3.81%	<0.01
Glucosa deshidrogenasa	2.27%	<0.05

Estos datos indican que puede producirse una disminución significativa en el rendimiento de glucosa por oxidoreductasas presentes en abundancia muy baja en un sistema enzimático celulolítico. La eliminación o reducción de estas actividades enzimáticas mediante cualquier medio produciría, por tanto, recuperación de glucosa mejorada.

EJEMPLO 15

SACARIFICACIÓN DE FORRAJE DE MAÍZ PRETRATADO CON ÁCIDO

En este ejemplo se describen experimentos realizados usando CF-404 sobre forraje de maíz pretratado con ácido. En estos experimentos se añadió 0,81 % al 6 % de CF-404 (con respecto a la concentración de glucano) a una mezcla de agua y forraje de maíz pretratado (NREL) (90 g/kg de glucano) a una concentración de celulosa de 9 % y pH 5. La mezcla se incubó a 55 °C, con agitación durante 73 horas. Durante esta incubación se tomaron muestras periódicamente y la concentración de azúcar se determinó usando HPLC, usando métodos conocidos en la técnica. Se encontró que la celulosa y el xilano residual se habían convertido a sus azúcares monoméricos con alto rendimiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula fúngica de *Myceliophthora thermophila* que ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de actividad enzimática oxidante de celobiosa endógena de dos o más enzimas oxidantes de celobiosa endógena que se producen por la célula fúngica, en la que la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para deleccionar al menos parcialmente los genes que codifican las dos o más enzimas oxidantes de celobiosa endógena, en la que la primera de las dos o más enzimas oxidantes de celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 6, y en la que la segunda de las dos o más enzimas oxidantes de celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 8.
- 10 2. La célula fúngica de la reivindicación 1, en la que la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para reducir la cantidad de celobiosa deshidrogenasa endógena que se produce por la célula fúngica y para aumentar la producción de al menos una enzima hidrolizante de sacárido.
- 15 3. La célula fúngica de la reivindicación 2, en la que la al menos una enzima hidrolizante de sacárido está seleccionada de endoglucanasa, celobiohidrolasa, beta-glucosidasa, endoxilanasas, beta-xilosidasa, arabinofuranosidasa, alfa-glucuronidasa, acetilxilano esterasa, feruloil esterasa y alfa-glucuronil esterasa.
- 20 4. La célula fúngica de la reivindicación 2 o 3, en la que la al menos una enzima hidrolizante de sacárido es: (i) endógena a la célula fúngica y/o (ii) se expresa en exceso por la célula fúngica.
- 25 5. La célula fúngica de la reivindicación 4, en la que la enzima hidrolizante de sacárido expresada en exceso por la célula fúngica es beta-glucosidasa.
- 30 6. Un método de generación de celobiosa y/o glucosa que comprende poner en contacto celulosa con una mezcla enzimática que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en el que la mezcla enzimática se produce por la célula fúngica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y en el que la mezcla enzimática comprende una glucósido hidrolasa 61 (GH61), una celobiohidrolasa tipo 2b (CBH2b), una celobiohidrolasa tipo 1 (CBH1), una beta-glucosidasa (Bgl) y al menos una endoglucanasa (EG).
- 35 7. El método de cualquiera de la reivindicación 6, en el que la celulosa comprende lignocelulosa pretratada.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por un método de tratamiento seleccionado de pretratamiento con ácido, pretratamiento con amonio, explosión por vapor y/o extracción con disolvente orgánico.
- 45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la mezcla enzimática es una mezcla libre de células.
- 50 10. El método de cualquier de las reivindicaciones 6-9, que comprende además fermentación de la glucosa a un producto final.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, en el que el producto final es un alcohol combustible o un producto químico industrial de precursor, y en el que el alcohol combustible es opcionalmente etanol o butanol.
- 60 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que dicho proceso para producir celobiosa y/o glucosa a partir de celulosa y dicha fermentación se realizan en un proceso de sacarificación y fermentación (SSF) simultáneo.
- 65 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-12, en el que el método es un proceso discontinuo, de lotes alimentados o continuo, o una combinación de procesos discontinuos, continuos y/o de lotes alimentados realizados en cualquier orden.
- 70 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6-13, en el que el método se realiza en un volumen de reacción de: a) al menos 10.000 litros o b) al menos 100.000 litros.
- 75 15. La célula fúngica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 6-14, que comprende además una enzima que degrada celulosa que es heteróloga a la célula fúngica.
- 80 16. Un medio de fermentación que comprende la célula fúngica de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

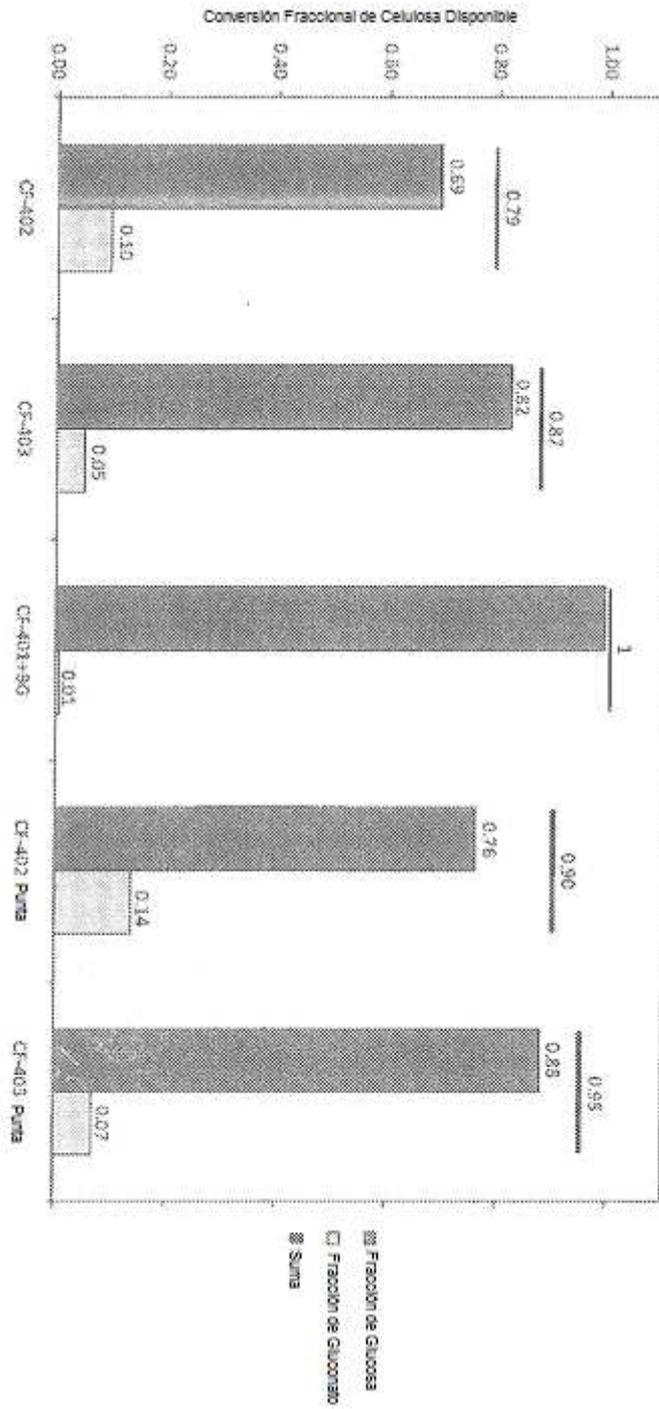


Fig. 1

Fig. 2

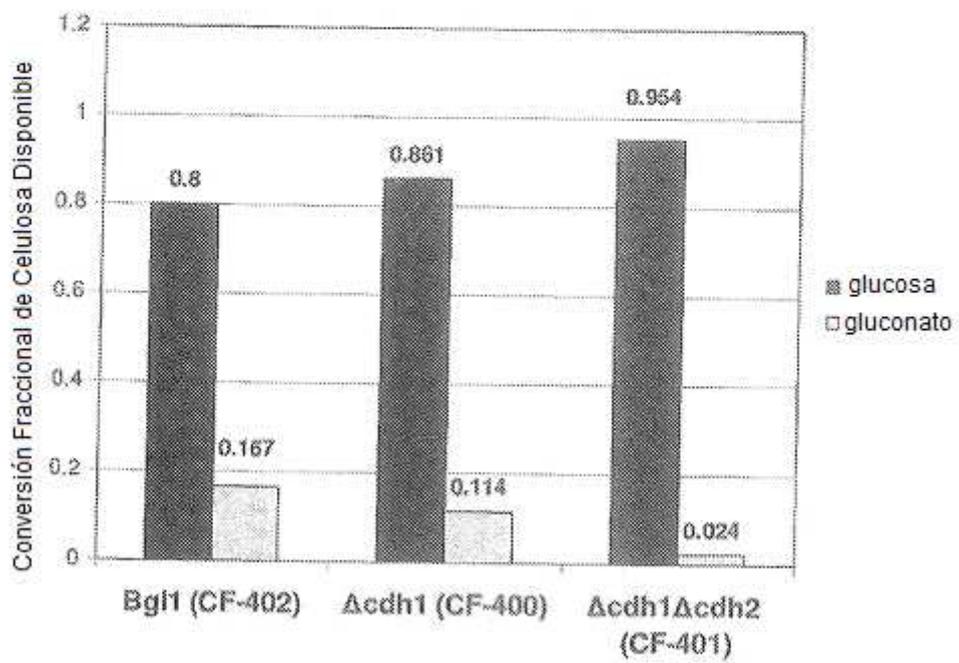


Fig. 3

(*M. thermophila* -- CDH1)

Secuencia del Nucleótido (SEQ ID NO:8)

ATGAGGAOCTCCTCTCGTTTAAATGGGTGOCCTTQCGGCGGCACTCTYGGCCTCTGCCITGCGCAGAACACCGCCGCGTAAAC
 CTTACCGGACCGGACTCGGGCATTACCTTCAACACGTGGGGTCTOCCCGAGGATTCTCCCCAGACTAAGGGCGGTTTCACTTT
 TGGTGTGCTCTGCCCTCTGATGCCCTCAGCAGAGACGCCAAGGAGTTCATCGGTTACTTGAATGCGCBAAGGAAGATGAGA
 GCGGTTGGTGGGTTGTCTCCCTGGGCGGCGCCATGACCAACTCGGTCCTCATCGCGCCTGGCCCAACGAGACACCGTCTA
 CACGCTCTCCGCTTCCGCAACCGGGTATGGGATGCGGGATGTOTACCAGGGGGACCGCGAGATCAGCCAGGTTCTCTCTCTG
 TCAACTCGACGCACTTGAACCTCATCTTCAAGTGGGAGAACTGCTTCAATGGAATGAAAGCGGCGCCACCGGCGGTGCTCC
 ACCTCGAACCGGCTGTGGTCTCGGCTGGGTCGAGGCATTCGCGC&CCCGGGAA-CCGACCTGCGCCGACCGAGATCACCC
 TCGAGCAGCACGACACCGGATGAGTATCTGGGGTCCCGAGCTCAACTCGGAGCCCGACCGCCGTTCTACACCGGATGGGC
 CGCCGAGGCCACCAAGACCGTCAAGGGTGAATCGGGCGGTCCCACCGAGACCTCTGTCTGGTGTCCCGGTTCCGAGGGG
 GTCTCTGTTGATTAATCATCTCTGCGGGGCGGTGCGGGTGGCATCCCGCGCGCCGACAAAGCTGAGCGAGGCCGGGAAGAGT
 TGTCTGGTATGAGGAAAGGGCTTGGCTCGACCGCCAGCACCGGAGGCACTCTGGGCGCGGAGTGGCTCGAGGGCCACGACCT
 TACCGGCTTTGACCTGCGCGGTCTGTGCAACAGATDTGGGTTGACTCCAAAGGGATCGCTTCCGAGGATACCGACAGATGG
 CTGGCTGTCTCTCGCGCGGGTACCGCCCTGTAAATGCGGGCTGTGGTTGAAGCCCTACTCGTGTGACTGGGACTACCTGTTC
 CCTAGTGGTTGGAAAGTACAAGACGTCGAGCGGCGCATCAACCGCGCCCTCTGGCGATCCCGGGCACCGATGCTCCCTGGAC
 CGAAGGCAAGGGCTACTACCAACAGGGCTTGAAGTCTCTTCAAGGGCTTGGCCCGCGGGCGGCTGGACCTCGGTCACGGCC
 AATAAGCGCGCAGAGAAAGAAAGCGGACCTTCTCCATGCGCCCTTCAATGTTCCCGCGGGCGGAGGCGCAAGCGCGCGCTGG
 GCACCTACTTCCAGACCGCCAAAGAGGGCAGDCAACTTGAAGCTCTGGCTCAACACGTCGGTCAAGCGCGTCAATCCGCGAGGG
 GGCCACATCACCGGCTCGAGGCTTCCGCGACCGGGTACCAAGGGATGTTCCCGTCAACAGGTTACCGGGC
 GCGTATCTCTCTGCGGGTACCTTGGCGGTGCAAGATCTCTGAGGAGCGGATCGGTCGGAACGATCAAGTTCAGGTT
 GTCCCGGCTCGGAGAAAGATGGCCCTACCATGATCAGCAACTCGTCTGGGATCAAGCTGCGCTGCGGCTAGAAGCTGGATGA
 CCACCTCAACACCGGACACTGTCACTCCCAACCGGACGTCGTGTTCTACGACTTCTACGAGGGGTGGGACAACTCCATCCAAGT
 TGACAAGGACAGCTACCTCAACTCGCGCACGGGCACTGCTCGCCCAAGCGGTCOCCAACATTGGGCTATGTTCTGGGAAGAGA
 TCAAGGGTTCGGAGCGGATGTTCCCGAGCTCCAGTGGACTGCGCGTTCGAGGGCAGCGCTGGGTGCCCGCAAGGGCAAGAC
 CATGACCATGTCGAGTACCTCGGCTCTGCTGCGCACTCGCGGGCGGCGATGACCATCAAGCGTCCCTGACAACTGTCTGTCT
 CGGACBTGCCCTACCTCAAGGACCCCAACGACAAAGGAGGGCGGTCATCCAGGGCATCATCAAGCTGCAAGAGCGCCCTCAAGAAC
 GTCGGCAAGCTGACCTGGGCTCTTCCCAAGTCCAGCATCAAGCGCGCCCAATACGTTGAGAGCATGGYGGTCTCCCGGAGCAA
 CCGGGCTTCAAGCACTGGATGGGACCAAGAGATGGCAGCGAGCAAGGGGCAAGGGCGGCTCGCCGCTCTGCGAAGCTG
 AACAGCAAGGCTTACGGCACCGAACAACCTCTTCTGATCGAGCGCTCGATCTTCCCGGGCTGCGCACCGACCAACCCCACTGG
 TAGATGGTGAAGGGCTCGGAGCACGCTCGGCGCGCATCTCGCGCTGCGCGACCTCACCGCCCTCCCAAGTACGGGCAAT
 GCGCGGCGCGGAATGAGGCGGACAGTTCCTGCGCGCACGGCTCACGCTGCGCAGATGACAGAGGAGTGGTACTCGCAGTG
 CTTGTGA

AA secuencia(SEQ ID NO:8)

MRTGSRLLKALAAALPBAACNNAPVTFDPSGGITFNTWGLAEDSPQTKGGFTFQVALPSDALTTDAKEFNGYLYKARNDGSGWOG
 VSLGGPMTNLLIAAWPHEDTVYTSLRFATDYAMPDYYGGAEITQVSSVNSTHFLIFRCENCLQWSQSGATGGASTGNGVLYG
 WVQAFADPGNPFCDDITLQHDNMGMIWGAQLNSDAASPSYTEWAAGATKIVTGDCCGPTETSIVGVVYPYTVSFDYIVVGGGA
 GGIPAAADLSEAGKSYLLIEKGFASANTGSLGPEWLEGHDLTRFDVPLCNQIIVVDSKGIACEDTDCMAGCYLGGGTAVNAGLWF
 KPYBLDWDYLFPSGWKYKDYQPAINFALSRIPGTDAPSTGGKRYVQQGFDVLSKGLAGGGWTSYANNAPDKNRTFSNAPFMFAQ
 GERNGPLGTIFYGTAGKPSNFKLWALNTSVKRVIRQGGHITGVEVEPFRRGGYQGVVYTKVYGRVLSAGTFGSKILLRSQGGPNDC
 QVVAASEKDDPTMISNSWINLPVGYNLDDHLNIDTVISHPDVVFYDFYEAWDPNIDSDKDSVLSNRTGILAQAAPNIGPMFWEEIKG
 ADGIVRQLQWTRAVEGSLGAPN&KTMIMSOYLORGAF&RGRMTTTPSLTYVVDVPLYKDPNDKEAVIQGIINLQNALKNVANLTLWLF
 PNSTHTPRQYVDSMVVSPSNRRGNHWMTNKGTDGGRKGGSAVVDLNTKYVGTDLNLFVIDASIFPVPTTNPFSYVITASEHASARIL
 ALPDLTPYKYGCCGCGREWGGFVCAAGGTCGMQNEWYSOCL*

Fig. 4

(*M. thermophila* -- CDH2)

Secuencia del Nucleótido (SEQ ID NO:7)

ATGAAGCTACTCAGCCGCGTTGGGGCGACCGCCCTAGCGCGGAGGTTGTACTCCAGCAATGTGCAGCCAGATGACCCGAGG
 GGAACCTACACCCGATGAGGCTACCGGTATCCAATTCAGACGTTGGACCGCTCCGAGGGGGCCCTTTCCAGTTTGGGTTGACCC
 CTCCCGCGGACCGCTGGAAAAGGATGCCACCGAGTACATTGGTCTGCTGCGTTGCCAAATCACCGATCCCCTCCCGCAG
 CTGGTGCCTATCTCCACCGCCAGTCCCGCCAGATGACGCGAGCGCTGCTGCTGGTCCGCTGSSCCAGCGAGGACACCGCTC
 YACAGCTGTTCCGCTACCGCCACCGGCTACACGCTCCGGGCGCTCTACACGGGCGAGGCCAAGCTGACCCGAGATCTGCTCTC
 GGTCCAGCCAGGACAGCTTCGAGGTGCTGTTCCGCTGCCAAAACCTGCTTCTCTGGGACCCAGGATGCCACCAAGGGCAACCTCT
 CGAACCGCAACGGCAACCTGGTCTCGGCCCGCGCCCGCCGAGGATGGTGTGACCGGCCCCACCTGCCCGGACACGGCCCG
 AGTTCCGTTCCATGATAACGGTTCGACACAGTGGGGTCCCGTCTGAGGGGCTACTTCCGACTCGTACGAGGAGTGGGCT
 AAGCTGGCCACGACCCAGCCCGAGACCCACCTGCCATGGCACTGGCCCGCCGACAAAGGAGTGGCTTCCGCTCCCGAGGACA
 CGTATGATTACATCGTTGTGGGTGCCCGCGCCCGGTGGTATCACCGTCCCGGACAAAGCTCAGCGAGGCCCGCCACAAAGGTCCT
 CTGATCGAGAGGGGACCCCTTCGACCGGCTGTGSAACGGGACCATGAAGCCCGAGTGGCTCGAGAGCCACCGACTTACCG
 GCTTGGACCTTCCCGGCTGTCACACCGATCTGGGTCGACTCTGCCCGCATCGCCGACCGGATACCCAGACAGATGGCGGG
 CTGCTTCCCGGCTGGCCACCGCTGTCAACCGCTGGTTTGTGGTGGAAAGCCCGACCCCGCTGACTGGGATGAGAACTTCCCGG
 AAGGTTGGAAAGTGGAGCGATCTGGGGATGGACCGAGCGTGTCTTCAAGCGCATCCCGGGCACCTCCGACCCCTCGCAGGA
 CGGCAAGTGTGACCGCCAGGAGGCTTGGAGTCTACAGCAAGGGCCCTGGCCAAAGCCCGCTGGAAGGAAATCAGCGCCAAC
 GAGCGCCCGAGCGAGAAGACACACCTATGCAGACACCGAGTTGATGTTCTCGGGCGGTGAGGCTGGGGCCCGCCCTGGGGA
 CGTACCTTCCCTCGGCTGCCGAGCGCAGCAACTTCAACCTGTGGCTCAACACTGCCGTCCGAGAGGCGCTCCCGCAGCGGACG
 CAAGGTCACCGGCTCGAGCTGAGTGCCTCACCGACCGTGGCTTCAAGCGGACCGTCAACCTGAAATGAGGGCGGTGGTGT
 ATGTTCTCGGCCCGGCTTTCGCTCGGCCAAGCTGCTCTTCCGACCGGTATCGGTCCTGAGGACCGCTGAGATTGTGGC
 GAGCTCCAAAGGACGGCGAGACCTTCACTCCCAAGGACGAGTGGATCAACCTCCCGTCCGGCCAGAACCTGATCCAGCATCTCA
 ACACTGACCTCACTTCAAGGACCGGATGCTGCTTCTATGACTTCTATCGGGCTGGGACCGACCCATCCGAGGATGAAAGG
 AAGGCTACCTGAAGTCCGCTCCCGCATCTCCGCCAAGCGCGGCCAATATCGGCGCTATGATGTGGGATCAAGTACCGCG
 TCCGACCGCATCACCCGCCAGTTCCAGTGGACATGCCGTGTTGAGGGCGACAGCTCCAAAGACCAACTGAGCCACCGCATGAC
 CCTCAGCCAGTACCTCGCGCGTGGGCTGCTCTCCCGCGGCCGATGGCCATCACCTCCCGGCTGAGGACCGACCGTCCCGCA
 GCACCGCTACCTGCACAAACAACCGGCACTCCAGGCGGTCACTCCAGGGGATCCAGAACCTGGTGGACCGCGCTCAGCCAGGTTG
 GCGACCTCGAGTGGGCTCTCCCGCGCCCGACCGGACCGTGGCGGACTACGTCACAGCGCTGATGCTTCCCGCCCAACCG
 BCCCGGCGAAGCACTGATGGCACCGCCAAAGCTGGGACCGGACCGCGCGCTCCGGCGGCACTCCGTCCTGAGCTCG
 ACACCAAGGTGACCGGACCGGACCAACCTGTTGCTGCTCCAGCGGCTGGCTCTTCCCGGCGATGTCGACCGGCAACCGCTCGCC
 ATGATCGTATCGTGGCCGAGCGGCGGCCAGCGCATCTCGGCCCTGGGCTCAA

AA secuencia (SEQ ID NO:8)

MKLLSRVGTALAAATLSLQCAAGMTGTYTDEATGIGFKWTASGAPFTFGLTLPADALEKDATEYIGLLACQITDPASPSWQISH
 GGGQMTQALLVWASEDTVYTSFRYATGYTLPGLYTGDALTKGSSVSEDSFEVLFRCNCFSWDDQDTKGNVSTSNGLVLG
 RAAAHQDVTGPTCPDTAEFGFHDNSFGQWGAVLEGATSGSYEWAHLATTPETTCDDGTCGPKCEVPAPEBTYQYIVYVAGAGDI
 TVADKLEAAGHVLLEKQPPSTGLWNGTMRPEWLESTDLTRFDVPLGNQWVDSAGIACDTDDQAGCVLGGTAVNAGLWVWKP
 HFAWDENFPEDGWKSSDLADATERVFKRIPGTSHPSCDGNLYRQEGFEVSKGLANAGWKEISANEAPSEKNHTYAHTEPMFSGGE
 RGGPLATYLSAAEERSNFNLWNTAVRRAYRSGGKVTGVELECLTGGGFGCTVNLNEGQGVIFSAGAFGSAKLLLRSGIGPEDGLEIV
 ASSKDGFTFKDEWNLVPGHNLIDHLNLTDLIIFHDVVFYDFYAAWDEFITDKKEYLNSRSGILCAAPNIGPMMWLDQVTPSDGIR
 QFQWYCRVEGDSKNTSYHAMTLSOYLGRGVVSRGRMGITRGLSTTYAEHPYLHNGDLEAVIQGQNVVDALSCVADLEWVLPFP
 DGTVADYVNSLIVSPANRRANHWMTAKLGTDDGRGGTSVVDLDTKYVGTDLNLFVVDASVFPQMSSTENPSAMIVVAEQAAQRILA
 LRS*

Fig.5

(*M. thermophila* – GO1)

Secuencia del Nucleótido (SEQ ID NO:1)

ATGGGCTTCCTGCGCGGCACTTBTGTCTCTGTGCGGCTCTGCGGAGCGGAGCAAGCATCCACGTCCCATGCGCAAGCGCCA
 GGTCTCCGAGCTTCGGGACGATTATGACTTCGTGATCGTTGGCGGTGGAAGTATGCGGCTGACTGTAGCCGATCCGCTGACAG
 AGGCCCTTCCAGDCAAGAAGCTCCTTBTGATTGAGTATGAGACATCGACTACGCGCCGGAADCTTGTATCCGCGACGGAC
 TGGATCACACCTCAGCGTGTATGCGCGCCCTTGTGTGTCTTCAATTCCTCCGCAACCCAGACATGGCAACACAACAGCGTTT
 TGCTAGCGCGCCAAATGCTGTGGGTGAAAGCAATGCGGTGAAAGCGCATGTTCTTTGACCGCCCATGCCGCDACGACTACGATG
 GTGGAAACCGCGTDCGGCGGCTCCGGGTTGAAACAGTCCAGCCACAAGTGGGACTGGGAGGGGTGTCTCCCTTTCTCCGAAAG
 AGCCTCACGTTACGGAACCGCGGGCGGACATCGTCCAGAAGTATCACTACACCTGGGACCTGTCTGCTACGGCAATGCTC
 AACCCCATCTACAGCAGCTATCCGCTCTCCAGTGGGCGGACCGCGTTACTTAACGAGGCATGGGAGGAGATGGGAATCA
 ATCCGCTGACCGAATGCCCGCGCGGCGACAAGGAGGGTGTGTGCTGGGTTCCCGGCTGCGAGCACCCCTGTCCACGCGGAA
 GGTCCGACCGCGCGGCTCCGCGCACTACGCGCATGTGTCTCCGCGGAGCCAAATACGACCTCCTGCTTCAACACCGAGTTGTGAG
 GTAGTATTCCCGCAATGGGCGGAGCGACCGACCGCGCTTGTCCAGCGCGGCTCCCTGGCGGACAACCGACCTGTTCACGCTGAC
 TBTGAAGGCGGAAGTATGATCTCCGCGCGCGCTCTGCACACCGCGACCGTCTTCAAGCGAGCGGATGGCGCGCGATCC
 TTCTTGGAGCGCCCGGATCCCGGTGACGCTTGACTGCGCGCGCTCCGCGCGCAACCTCCAGGACGACTCGGCTCCCGCG
 TCAAGTGGAACTACACCGAGCGCTACACCGGCTTCTTCCCGCTCCCGTCCGAGATGGTCAACACCGCGACCTTCAAAAGCGAA
 GDCATCACCGGCTTCGACGAGGTCGCGCGCGCGCGCGCGCTACACCGCTCCCGCGCGCAACAACCGCATSTTCTGTATCGCTCC
 CACACCTCAAGCGCGACTACGCGCGCATACCGCGCAATATCCGCGCGCATGCTCCCGCGCAAGCGCGCGCGCTCTATCTCGCG
 GCGGACGCTCCGCGCGATCCCGGGATGGTTCGCGGCTADGAGGCGGAGCTCCTGCTGCTGCTGCGGACCTGCTGACAAAGCGG
 AGCGCGCGCGCTGCGGAGCGCGCTGCGCGGACGAGGCG
 TGAGCGCGCGCGCGCGCTGCGGCTCAACCTCAAGCGCGCGCTCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CGGACATCGACCTGCACCTCGCGCGCGCGCTTCTGCGCGCGCGCTGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GAGACGCGCGCGCGCGCTCG
 ATGCAACCGGCTGCG
 GAGGCGCTGAGCGGCTGCG
 GAGAAAGCTGCGGATATATCATCCAGGAGTGGATGGACAGGAGCGAGTGA

AA secuencia (SEQ ID NO:2)

MGFLAATLVSCAALASAASIPRPHAKRQVSQLRDDYDFVIVGGTSGLTVAADRLTEAPPAKINLVIEYGGVHYAPGTDPPTDWTTPQ
 PDAPPSSWSPNGLPNPDMANTTAFVLAGQVVGGSVAVNGMFFDRASRIIDYDAWTAVGQSGFEGSSHRWQWEGLPFFPKSVTFTE
 PPADIVQKYHYTWLSAVNGSTPIYSSYPVFWADQPLINQAWCEMGINPYTECAGGDKGVCWVPA5QHPVFAARRSHAGLGHY
 ADVLPFRANYDLLVQHGVVVRVFPNGPSHGPPVLEARSLADNHLFNVTVKGEVHSAGALHTFTVLQFSGIGPASFLDAGIPVTLDLPG
 VGANLQDHCGPPVTVWNYTEPYTFFPLPSEMVNNAATFKASAITDFEVPARGPYTLAGGNNIAFVSLPHILTADYGAITANIRAVACG
 TAASYLAADVRTIPDMVAGYEADLVADLLDNPEAPSLTPWATSEAPQTSSVLAFLIHPLSRGSVRLNLSPLACQVLDYRSGSNP
 VDIDLHLAIVRFLRGLLDTPTMQARGALETAPGSVAVDSEALGEYVVRGHTLSFMHPCCYAAMLPEDRGGVVGPCLVKHGAEGLRV
 VDM5VMPPLPGAHL5ATAYAVEKAAADHIIQEWMDKED*

Fig. 7

(*Aspergillus oryzae* -- Piranosa Oxidasa)

Secuencia del Nucleótido (SEQ ID NO:3)

ATGTCATGACATCAGGACSTCAAGCGYTTAGTTCGAGTGGCAGAGATTCAAATACDACAATTCATYTTGGTTGGCTAATTCAGC
 GACTCTGACACTTGGCTDADGATGCAGGTCTGTGGGTCCGGCCCCATCGGCGCCACCTATGCCAAGATTCTACCTGACGCGG
 GCAAGGATGTCCTCATGTTGAGACTGGCACCCAGSAAAGTAAAGATTGCTGGAGAGCATAAGAAAGATGCTATCAAGTACCGA
 AAGATATCGATGCTTTTGGCATGTCATTAAGGTAATCAGCTCAAGAAITAGCACTTTGAGTGTATTTCTCTAACTTTCGATSTYD
 TCCCTCTTTCAGGGAAGTCTACACFACAGCTCTGTACCGACCAACAAGCCCGCTTCCTAAGACTGGCTCCGATCTCCTGGAAAG
 CGAACCGGCCAAATTTCAAGGACAGAATCCCGCCAGGATCCAAACGTAAACCTGGATGCCAATGGTGTGGCACGTAATGTGG
 GCGCATGCTACCCACTGGACTTTGTGGACTCCCGCAGAGAAAGAGAGGTTGAAACGCGAGATATATTCAGTGGTGACGAAT
 GGGATAGCCTGTACAAGGAGGCGAGAAAGTTGATCGGAACGAGCAAGACTGTCTGAAATGACTGGATCCGGCAAGAAATTTGTC
 ATGGAGATTCTGAATGACGAGTACCGGAAGCGATCAGCGCAACCACTACCTTTGGCTGCCAAGAGGAATGGCAATACCGGCTA
 CATCACTTGGTCTATCCCTCAACTATCCTTGAACGATGAAGCTTAAGAAAGAAATTTACACTATGGCCCGAGCAACACTGTGAG
 AAGTTTAAAGTCCAGSAAACAGATAACGGCCAGAGGTCAACAAGGCTATAATCCGAAACTCGCCACAGATAAACTGATFACA
 GTTAAAGGGAAABTATTTATCGCTTGGCGGGGCTATACTTACACCCAGCTAGTTTCAATTGGGGTTCSTGCCGACAAAG
 CCGAAGAGGGATCCAGAACCCAAATACCATTAGAAGACGACGAGAAAGGCATCCCACTCCACCGGATACTCTGGAGCATCTC
 AAGCTTCTGCTGTAGGACGCTATCTGACAGAGCAAAAGCATGTGCTTCTGCCAAATTTGTTCTGAAAAAGAAATGGATTGAGGCAG
 TGGCTAATCCAAAAAGAACTTATCAAAGCGATGGGGTGAAGGCAAAAAGTGGGAGAGGCTCAAGGAAGGGTGGAGGAA
 AGGGTCCAGGAAGATATGAAAAGGTTTAAATGACCTTATTCCTTCCCTTCGATGATTTGGACCTCAGGTTACTCTACCTTGG
 ACTATCACCATCCGTGGCATAACCAATCCATCGCGATGCTTCTCTATGGGCGACACCCCGAGCCATTGATAAGCGGACCA
 TTGTTGACCTCCGATTCCTCGGAAGCGTTGAGCCGACTGGAGAAGTATGTAAGCTTTGAAACCGACATCAGGGATGCTACG
 GCATGCCCCAGCCACTTCCCTACAAGCTGAACGATGAGGATCCCAACCGTCCGACCGATGATGAAAGATATGGAAGAG
 GCGGCTGGTGTCTGGGTGGCTACCTCCAGGGTGGAGGCTCAATTTGTAGCTGCTGGGCTTGCCTGACACTGACGCTCTGTGTTAC
 GACTAGAGGCTCAGAAGAGGAGAAAGAGTGTGACCTGATCCAAAGAGACCTCGTCTGGATGAGAAGCTCCAAAGATCTGGG
 GTATCCACAACCTGTACGTGGTGGTTAAATGTGATCCCTGGTCCAATGGGTCCAACCTACCTTGACAGCAATGTGCTTCG
 CCATCAAAAGCGCGAAGAGATCCTTGAAGGGAATTTTAG

AA secuencia (SEQ ID NO:10)

MGMTSGRQAFTEICRDSNTNSFWLANSPTLTGGTMOVVGGSPIGATYAKILADAGKDVLMVETGTGSEKIAGEHKKNAINYQKID
 AFVHVIVKISSRISTFEQISLTFGLLFGSSLHYTSVPTNKAAVPLAPISWKNANGQIFNGGNPRDFFNVLGANGVARNVGGMSTHW
 CATPROKEKVERSDSFDSEWDSLYKEAEKLGITKTLVNDISRCDELVMEILNDEYKRSAPLPLAAKRNNGTAYITWSSSTILDAM
 NKKKFTLWPEHKEKFKVEEDNRSPQVTKAIRKLTGKLTLYKAVPIACGAPLTPCLLPSGQVPTKPNRDPRTQPILEDKGI
 PPGTLEHKLPLALGRYLTEQSMCFQIVLKKEWIEAVANPKNPNYQSDGVKRIKQVEKLEQWKEHVEDEHMKRFNDPIPPFFOOLDPQ
 VTLPLDYHHPWHTQIHROAFQYGAAPPADKRTIVDLRFFGTVEFDWKNYVTFETDIRDAYGMPQPTFRYKLNDEDRKRGHGMKDM
 EEAAGALGGYLPGSEPOFLAPGLALFVCGTTRAGKKEKECCOPDKETSCDENSKIWGIHNLVYGGLNVIPIGANGSNPILTAMCFAIK
 SAKSILEGNS

Fig. 8

(*Acremonium strictum* -- Glucooligosacarida Oxidasa)

Secuencia del Nucleótido (SEQ ID NO:11)

ATGGTGGCGATCCAAGAGCTCACCGCGGCTTGAGGCTCGGCTCAGTGGTCCAGGCTTCATGATCCAGAAGCCCAACTCAAT
 CAACGCGCTGCTCGCCGCGCCGACGTCGAGTTCCACGAGGGAAGACTCTGAAGGCTCGGACATGCAACGACACAGCCTTCAAC
 CTCGCGCTCGACTACGACCCAGCTGCCATTGCCATCCCTGGCTCCACCGAGGATATGGCTGCTGCTGTCOCAGTGCCTCTTGAT
 GCTGGTGTGACATCTCCGCAAGGGTGGTGGTACAGTTACGGTTCCTTATGGGTTCCGGTGGTGGGATGGTCACTTATGTTG
 GAGCTGGATCGTATGACCGTGTGTCGGTTGATGATAATAATGTGGCGACTATTGAGGGCGGCTGCTGCTTGGATACACTGGT
 CTCGAGCTTCTTGAACAGGGTAAAGGTGCACTTTCTCACGGTACTTGGCTGCGCTGGTGTGGCGGTCACGTCCTCGCGG
 TGGTTACGGTTTCGCAAGCCACACCGAGGCTGACCGCTCGACTGGCTGATCGGGCCACCGTCTGCTCTGCTGATGCTCCAT
 CGTGCADGTCTCCGAGACCGAGAAGCCGATCTCTCTCGGGCCCTCCGTGGCGCGCGGCTGGTTTCGCGATCGTCTCGGAG
 TTOGAGTTCAACACCTTCGAGGCGCCCGGAGATCATCAGCACTTACCAGGTCACCCACCACCTGGAAACCGGAAGCAGCAGCTTCCG
 GGCTCAAGGCTCTCCAGGACTGGGCTCAGAAGACCATGCCAGGGAGCTCAGGATGCGCTCTTGGATCAACGCCAACGCTCT
 CAAGTGGGAGGGTAACCTCTTGGTAACGCCAAGGACCTCAAGAAATTCCTCAGCCATGATGAAGAAAGCGGGTGGCAAGTC
 TACCATTCCAAAGCTCGTTGAGACCGATTGGTATGGCCAGATCAACACCTACCTCTACGGTGGTGAAGTCAACATCACTACAAC
 TACGACCTCCACGAGTACTTCTACGCCAACAGCTTGAACCGCTCCCGCTCTCTCCGACCGAAGCCATCCAAAGCCTTCTCGACTAC
 AAGTTCGACAACTCTCTCGTCCGCCC CGGCGCGGCTGGTGGATTGAATGGGACTTCCAGGGCGGCAAGAACTCTGGCCTGGC
 CGCCTCTCCAAAGCAGAAACCGCTACGCCACCGGAGCCAGCTCTGGCTCTGGGAGTTCAGGACGATCTATGACTACG
 AGAACAAACCTCTCCCTACCCGAGAGCGGTTTCGAGTTTCATGCAGGGCTTCTGGCTACCATCGAGGACACTCTCCCTGAG
 GACAGGAAGGGCAAGTACTTCAACTACGCCAGACCAACGCTTACCAAGGAGGAGGCGCAGAAAGTTGACTGGAGGGGCAACCT
 TGACAAGTTGCAGGCTATCAAGGCCAAGTACGATCTGAGGATGTGTTGGTAATGTTGCTCTGTTGAGCCGATTGGCTAG

AA secuencia (SEQ ID NO:12)

MVRIQELTAALSLAVVQASWICKRNRNINACLAAADVEFHEEDSEGWDMDGTAFNLRVDYGPAAIIPRSTEDI/AAVDCGLDAGVQIS
 AKGGGHRYSYVFGGEGDGLMLELDHMYRVSVDDNNVATICGGARLGYTALELLDGGNRALSHGTCPAVGVGGHVLGGGYGFATH
 THGLTLDWLKATVVLADASINHVSETENADLPWALRGGGGFANVSEFENTFEAPERITTYQVTTWNRKQHVAGLKALQDWACNT
 MPRELSMRLEINANALNWEGRFFGNKDLKGLQPEWKAAGGKSTISKLVETDWYQGNITLYGADLNITYWYDVHEFYANSLTAPRL
 SDEAIGARVDYKFDNSVVRPGRGWWRWDFH3GGKNSLAAYSNDETAYAHRDQLWLWOFYDSYDYENNTSPYEPESGFPEMCGFV
 ATIEDTLPEDRIKGYFNAYDITLTKKEAQKLYWRGNLEKLAQKAKYDPEEDVFNVVSVEMIA

Fig. 9

(*Agaricus bisporus* -- Piranosa Deshidrogenasa)

Secuencia del Nucleótido (SEQ ID NO:13)

ATGATACCTCGAGTGGCCAAATCAACTTTCGACTCTTGTCTCTCGCATTATTGGGGATTGAGGTTGCACGGCACTGCCAATCACAT
 ACCAAAACCCGACCGATTTACCTGGTGACCTTGACTATGATTTTCATCGTTGGCTGGCGGTGGAACTGCAGGTTTAGGTTGTGGCCCT
 CTGGTCTCAGTGAAGAAFCGGGAATGGAAATGACTGGTCAATGGAGGCCGGGCCCTTCCAACAAGGACGCTCTCGAAAACAGCGGTG
 CCTGGCCCTTCTCGGAACCCGGCCACGTTTGTATTGGAAATATACAACGATTCCTCAAGATGCTCTCCTGGCCAGGAGCCCTG
 AATTAAGTGGAGGGCGAAGCTCTTAGGGCGTTGCAGTACCCATAATGGGATGGTTTACACACGATGTTTCCAGAGACGATTGGGAC
 AATTATGCCCAGAAATGACCCGTAATCAAGCATTAGCTGGGGACAGGATCCCTACCTGTGATGAAGAGGGCTGAGAAATTCAGTAAAG
 ATTCTCTCATAAAGCGGTAAAGGGCCATATTGACCCCTCCGTCACCGGTTGGTGAACGAAAATTTCTCCGTGGTTCGCATGATACA
 CCAAAGCCCTCTTCAATGACTTATTACTGAAACCGCCAAAGAATTAAAGGGTGAATTTCCGTTCAAATTCGATATGAATGACCG
 GCGGCCCTCTTGGATTAACCTGGACTCAGTATACGATTTGATCAACCGCGGGGAGCGGAGCAGCTCGCAACAGCGTATTTAGAGG
 GTACTGGAATAACCTCCATGCTTGGTTAACACTCTTGTACCCTGATAGTCTCAGCAGAAAATGGGACCGGACTTCGGAAGCGT
 CGAGTTTGGTACTGATGCCGACACCCAAAGATCCAATTAACGAGCGAAAAGGAAGTCAATTGTATCTGGAGGAGTCAATCAATTC
 GCCTCAGATCCTCATGAATTCGGCATTGGGGCCGAGAGGCTGCTTGGAGCTAATGGAATGACACATTGGTGGDATAATCCGAG
 TGTGGGAAAAATTTATCGGAACAGGCTGCAAGAAATATAATGCTCGATACAACACTCCCTATTACTGATTTATGATGTTGATGACAG
 CGCTTATTGAATGGAAGAAGTCCGACACTGGACCTTAGCCCAAGGAGGTCGCCATAAACCCACTTACATGGGTACGATTGGCTG
 ATGACAAGTGGATGGACTTGTCTTCAAGTGGCCAAAATTCGCCACATATTGAGTTCGAAATTCGGGGCAAATTAGCCACCACT
 CCTCCGAGTGGTCTAACACGTTTTACTCTATCGACACTGTTCTCCAAATTCGGCCGTTGATCAACCTCTACACTGTTTCCGGG
 GGTTCTATTTCTCAGTAACAACGATCCGTTCTCCGACCGACTCATGATCTCAACATGTTTGGAGAGGAAAATAGATCCCGCTAT
 TGTGGTGAAGGATTTCCGAGTGCOCGAAAGATGCTTCTCCCAAGCATTCAAAGGCTTTGTCCGTTGAAAACGGTGTTCCTCCA
 AGCCAGCTACCTCTGATGAAGATTTGGAYACCTTCTCAAAAAGTCAAGGTTTTCTTACGTTGATGGTGTGGGAACGTTGTCTA
 TGTCTCTCAGAGTCCCTGGTGGGCTGTCTGTTAAACCTGATTTCCGTTGTCAAAGGAACCACTGGGCTTGGGGTTGTCCAGCCG
 TCTGTGATTCGATTCGCTCCGGCGGGGACACTCAAGAACTGTTTATGCAATTTGCTGAGCATGCAAGTGTGTTAATAGCCAAAGA
 GCTACAGCTAA

AA secuencia (SEQ ID NO:14)

MIPRVAKFNFRLLSLALLGIQVARSAITYQNPTDLPGDYDYDFIVAGGGTAGLVVASRLSENPEWNVLVIEAGPKNKDVFETRVPLGS
 ELRPFQWNYTTPCCDALGGRSLNYSRAKLLGGCSSHNGMYYTRCRDWDWNYAEITGNCAFHWDSILPVMKRAEKFSKDSHHPV
 KGHDPVYNGDQKLSVYASYTNAQFNLDLLETAKELGGFFPKLDMNDGNPLGLTWTQYTIQCRGERSSSATAYLEGTGNVHVLY
 NTLVTRIVBAENGTFRVEFATDADSPKIGLRRAKKEVIVGGVNSPQILNNGGGREVLGANGIDTLVDNPSVGHNLSDCAATIMLO
 YTLPTDYDVBAALHEWKKSHFGPLACGGRLNHLTWVRLPDDKLDGLDPSGGENSPHEPQFGCSHLLPSSGLTRFSGYRHCNPPPLI
 NLYTVSRGSHLNNOPFSHPLIDLNMFGEEIDPAILREGIRSAARMILSSQAFKQFVGETVFPDQATSDLDLTKTSTFSYVHVGVG
 LSMSPQASWGVYVNPDFRVKGTGSLRVVDASVYFFAPAGHTQEPVYAFAEHASFVJAKSYS

Fig. 10

(*Talaromyces stipitatus* ATCC 10500 -- Glucosa Deshidrogenasa)

Secuencia del Nucleótido (SEQ ID NO:15)

ATGCGACTTGGCTGTATGCGCGGAGGCCTCGCTCTGCTGCGTGGCCCTCGCTGCTCGCTGCGCAAGTGCAGCCCTTGGCAGG
 GCGCACCCAGATTGCGGAGGAATACGATTTTGTGCTGCTGGCGCGGCGCCAGGCTGGTCTCGTGATCGGAGCTCGCTGCTGCGG
 AGATTGCAAAATYATACAGTTCGCTGCTGCGAGGCGAGGCAAGGATGGAGACGAATTCGAGAAAGGAATAGGCACCTGCAAACTTTT
 ATACTCCGCATATTCCTACTACGATCACTATGACGACACCAATGAATGGGCATACTATACTGTGCTCAATCCCATGCGGA
 GAAATCGTCAAAATYAGTGGACCGGTGATAGGGGCTGGCGCGAAGTTCTGCGATCAACGGATTGTACCTGACTGCGCCCGGTA
 AAGAGGAGATCAATGCAATGGAAAGACCTGCTAGGAGACATGGACCGCGCGGACAAATYGTGCTGGGATTCGTTCTATGCTGCA
 ATGAAGAAAGAGCGAGACTTTTACTCCCGCTCGAATGAGATTGCTACAGAAAGGAAAGATTACATGGGAGCTTTGTACTCGTGGTA
 TTCAGGGACCGATTGAGGCAACBTATCCGGCTATACCTTCCGCCAAATCGCGCAATGGGTCATGCTCTCGAAGCAATGGGC
 ATTGCTAGTTCTAACGATATGTACGGTGGTGAAGGTATGCGCGCCGAAAGTCTCGACCTGAGTATCAATCCCAAGAACTGGACA
 CGCTCGTACAGCCGGACGGGATATCTCGACCGCTCGCAGACAAACGGCAATTAAGGAGTTGTCGCGGATGCGTTCGTCAGCGG
 CATTGCTTTGATGCTTCTCGGTCGAATAATCTGACAGCAAAACGGGTCGAGFATACTCTTGACAACGGCAAGACAACTGC
 ACGGTCAAGGTCGAAAGAGGCTGATCTTATGAGTGGGACGGTGGCAGTCTCGCGTACTGCTCCACAGCGGTCGCGTCC
 GAAAGATGTTCTTCAGATGCTGGAGTTGAGCTGGTGTCTGAACTTCTGGTGTGGGTCAACACCTTCAGGATCATTAAACAAC
 ACCCTTTATCTCTCTACATGATTAAGCCATGCGCTACATCAATTCACGCTGATGTACGGCGATAATCTGGAAGCACTACAGA
 AGAAGATCACCACTCAATCAACCAATTCGTTGGTGAAGACGACTTACGATGCTGGTTCATTCAGGATACAAAGCAATTGCAAA
 TATGACCGCAACGACAACTGCTGAGTGTCTGATGCGTGAAGTTCATGCGGCAAAATGAGCTCTTCTCATGAAATAGTGACTTAAACGGCGATTTGGT
 ATGACTGCTGGTCTTCAACATCTTACAGCCATGGACGATATACATCAATTCGCGAATGCGTTCGACTATCCCGTCAITGATCC
 GAATTAATCTTGGTCTTCTGCTGACTATGAAATGCTGCGGACCGGCTCAATCTAGCCCGCAACTCGGCAACACACAAACCCCTA
 AGCAGCTGCTAATAGCGGAAAGAAATCCCGGTTCCAGCGTCAAAACCGACGACACTGGCTTGAATGGATCCGCGAAGCGAC
 GGGGACAGAGTTCGACCCCTTCATGCTGCTGTGCGATGCTACCCGAGAGCAAGGCGGAGTATGCGATGCGAAGCTGCGGCTCT
 ACGGTCTTCCCAATGTTGCTGTTGCGGATGCCAGCGTTGTGCGGATTTGATTTGCGAAGGATCTTATGGCGTGGACGTATGGAG
 TCGCAGAACAGGCTAGTAATATCAATTCGTCGGACTACACGGATAGTAGGACTACAGGCACCAAGTGTTCGGATCTGCTGCTG
 CGTCTCACCGAAGGAGTGCATTCGCGGCTGAAAGGACTACTGGGCGATTAGTGTCTATACAGCGGCTTCTGGTGGTGA
 CGAAGCGTTCGCGGATCCGCTTGGGTTGCTGTTGTTGTCCTTCGAGCTGTTTTCATTTCCATTCCTTGCATTGA

AA secuencia (SEQ ID NO:16)

MPLQSIGAGLALLAALAVLAHVHALAPRTOIAEEYDFVYVGGQAGLVIGARLSEIANYTVLVLVLEAGTNGDEFREIRIGTYNFTPAYSS
 YYESLWTFPMNWAYTYVPGSHAENRDEWTRGKQLGGSSANGLYLTRPGKEINAWKDLLGGNDGADNWSWDSFYAANKGSETF
 TFPNSNEIATEGNITWQLSTRGCGPQATYPGTYTTPQVGEVWMSLEAMKSIASNDNMYGGEVYCAEVSTSGINPTNRWTRSYGRTGYLD
 PLADNNGYDVVADAFVTRHFDASSPSNMLTANGVOYTLNNGKTNCTVIVKKEVILSAGTVGSPAVLLHSGVGPKDVLSDAGVELVSE
 LPQVGHILQDHFNNTLYLSYDSAIYINSTLMYGDNLDALGNITGNGVNLNTYVAGVIAGVKAJANMTATLSSSIIQIELLFMNS
 DLNGDQITAAALQNPYSHRIYINSSNPLDYPVIGPNYLAVSADYHILRDLKLRCLGNTQPLSSCLIAETIPGFSVKITDDDWLEWIREA
 TQTEFHPSSSGAMLPRECGGVVDANLRVYGLANVYRVADASVYPIELSTHLMASTYGVABQASNIIRAHYTDGRTTGTSSSDPGSASSP
 TSSALGAEITGAI SAHTAPSGGVRBSVAVSAAWVAVVFAAAVSIPIHLH

Fig. 11

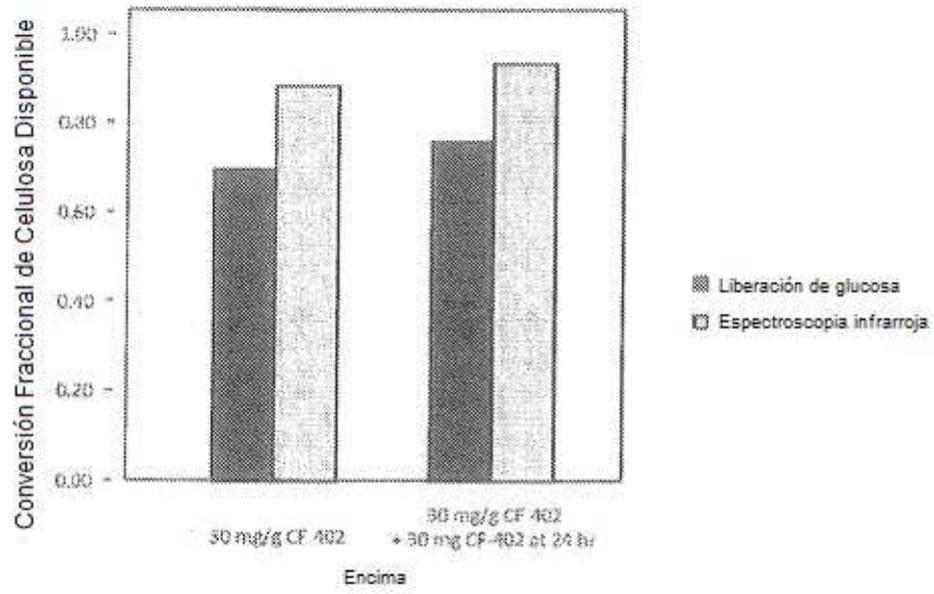


Fig. 12

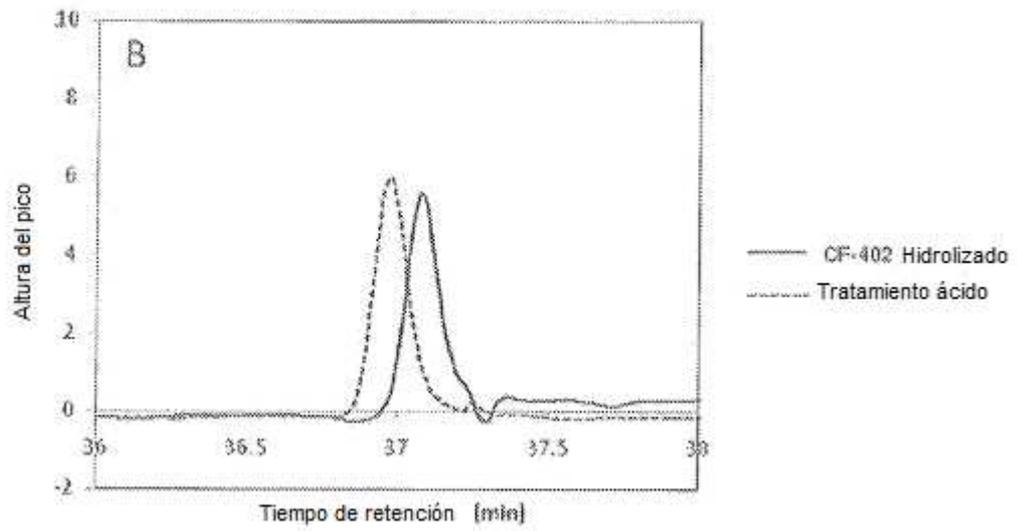
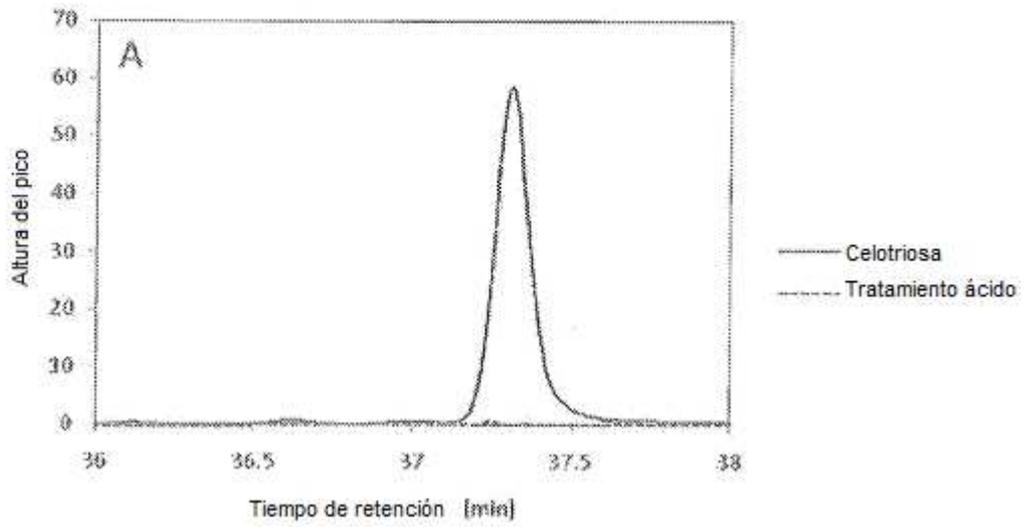


Fig. 13

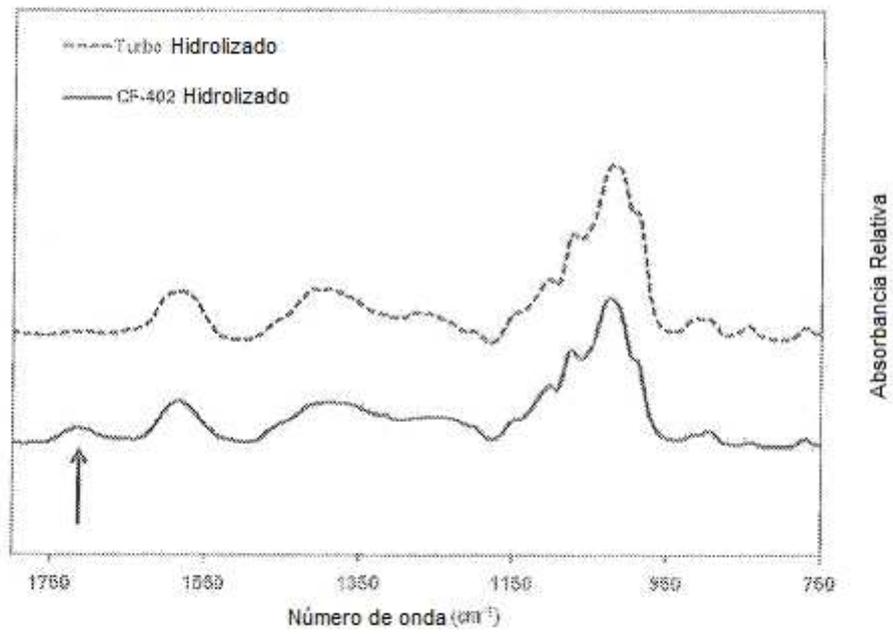


Fig. 14

