

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 054**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2010 E 10776907 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2496692**

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

30 Prioridad:

06.11.2009 US 259006 P

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

14.06.2016

73 Titular/es:

**NOVOZYMES, INC. (50.0%)
1445 Drew Avenue
Davis, CA 95618, US y
NOVOZYMES A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VLASENKO, ELENA;
MCBRAYER, BRETT;
SKOVLUND, DOMINIQUE y
LANDVIK, SARA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 574 054 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de xilanasa y polinucleótidos que los codifican

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de xilanasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.
La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped que comprenden los polinucleótidos al igual que métodos de producción y uso de los polipéptidos.

Descripción de las técnicas relacionadas

15 [0002] La celulosa es un polímero de la glucosa de azúcar simple enlazada por enlaces beta-1,4. Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos beta-enlazados. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas.
20 Las endoglucanasas asimilan el polímero de celulosa en ubicaciones al azar, abriéndolo a ataque por celobiohidrolasas.
Las celobiohidrolasas consecutivamente liberan moléculas de celobiosa de las extremidades del polímero de celulosa.
La celobiosa es un dímero de glucosa hidrosoluble beta-1,4-enlazado.
Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa para glucosa.

25 [0003] Lignocelulosa, el recurso de biomasa renovable más grande del mundo, está compuesto principalmente de lignina, celulosa, y hemicelulosa, donde gran parte de la última es xilano.
Xilanasas (por ejemplo, endo-1,4-beta-xilanasa, EC 3.2.1.8) hidrolizan enlaces 1,4-β-xilosídicos internos en el xilano para producir xilosa de peso molecular menor y xilo-oligómeros.
30 Xilanos son polisacáridos formados de D-xilopiranosas 1,4-β-glicosido-enlazados.

[0004] La conversión de materias primas lignocelulósicas en el etanol tiene las ventajas de la disponibilidad preparada de cantidades grandes de materia prima, la conveniencia de evitar quemar o depositar los materiales, y la limpieza del combustible de etanol.
35 Madera, residuos agrícolas, plantas de cultivo herbáceas, y desperdicios sólidos municipales han sido considerados como materias primas para producción de etanol.
Estos materiales principalmente consisten en celulosa, hemicelulosa, y lignina.
Una vez la celulosa y la hemicelulosa se convierten en glucosa y xilosa, la glucosa y xilosa se puede fermentar por levadura en el etanol.

40 [0005] WO 97/27290 A1 (1997-07-31) divulga la clonación de una xilanasa obtenida de *Meripilus giganteus* (CBS 5021.95) y sus secuencias.
También, composiciones enzimáticas que comprenden la xilanasa se describen con el uso de estas composiciones para la degradación de paredes celulares vegetales o material que contiene xilano de paredes celulares vegetales.
45 Usos específicos mencionados son cocina, piensos para animales, industria de papel y pulpa y elaboración de cerveza.

[0006] Decelle *et al.*: "Cloning, functional expression and characterization of three

50 [0007] "Phanerochaete chrysosporium endo-1,4-betaxylanases", Curr. Genet, vol. 46, nº 3,1 September 2004 (2004-09-01), pages 166-175, XP002426381, ISSN: 0172-8083, DOI: DOI :10,1 007/S00294-004-0520-X divulga la clonación de tres genes de xilanasa y su expresión en el *Aspergillus niger*.
Dos fueron de las familias GH10 y uno de la GH11.
Las xilanasas fueron también caracterizadas por su pH y temperatura, cinética, termoestabilidad, especificidad de sustrato e inhibición por metales pesados óptimos.
55 Las xilanasas son propuestas por usarse para reducción a pasta y fabricación de papel (bioblanqueo).

[0008] US 6,667,170 B1 (2003-12-23) divulga secuencias de xilanasa bacteriana y vectores de expresión para la secreción de proteínas bacterianas en hongos filamentosos en altos niveles de expresión.
60 El origen bacteriano es preferiblemente actinomicetos, especialmente Trichoderma.
La patente también divulga composiciones blanqueadoras ayudadas por enzimas para la adición a pulpa y un método para tratamiento químico de biomasa vegetal.

[0009] Hay una necesidad en la técnica para mejorar composiciones de enzima celulolítica a través de suplementación con enzimas adicionales para aumentar eficiencia y para proporcionar soluciones de enzima rentables para la degradación de lignocelulosa.
65

[0010] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad de xilanasas y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

5 Resumen de la invención

[0011] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de xilanasas seleccionada del grupo consistente en:

- 10 (a) un polipéptido con al menos 65% identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 65% identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; y
 (c) una variante que comprende una sustitución, delección, y/o inserción de 1-5 aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.; y

15 [0012] La invención también se refiere a tales polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º:2 o un fragmento del mismo con actividad de xilanasas.

20 [0013] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención; y métodos de producción de los polipéptidos.

25 [0014] La presente invención también se refiere a métodos para producir el polipéptido de la invención que comprenden: (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido; o que comprenden: (a) cultivo de una célula huésped que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

30 [0015] La presente invención también se refiere a métodos para degradación o conversión de un material celulósico o material que contiene xilano, que comprende: tratamiento del material celulósico o material que contiene xilano con una composición enzimática en la presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención.

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

35 [0016] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un producto de fermentación, que comprende: (a) sacarificación de un material celulósico o material que contiene xilano con una composición enzimática en la presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención; (b) fermentación del material celulósico sacarificado o material que contiene xilano con uno o más (varios) microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

45 [0017] La presente invención también se refiere a métodos de fermentación de un material celulósico o material que contiene xilano, que comprende: fermentación del material celulósico o material que contiene xilano con uno o más (varios) microorganismos fermentadores, donde el material celulósico se sacarifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención.

En un aspecto preferido, la fermentación del material celulósico o material que contiene xilano produce un producto de fermentación.

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

50 [0018] La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un péptido señal que comprende o consiste en aminoácidos 1 a 19 de SEC ID n.º: 2.

55 [0019] Dicho péptido señal puede ser operativamente enlazado a un gen que codifica una proteína; constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión, y células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos; y métodos de producción de un proteína.

Breve descripción de las figuras

60 [0020] La figura 1 muestra la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos deducida de un gen de xilanasas *Trichophaea saccata* CBS 804.70 (SEC ID N.º: 1 y 2, respectivamente).
 La figura 2 muestra una evaluación de xilanasas *Trichophaea saccata* GH10 a 10% de adición (0,35 mg proteína por g celulosa) a una composición enzimática de alta temperatura (3,5 mg proteína por g celulosa) en la hidrólisis de PCS lavado molido a 50°C, 55°C, y 60°C.
 65 La figura 3 muestra una evaluación de xilanasas *Trichophaea saccata* GH10 para sinergia con una composición enzimática de alta temperatura en la hidrólisis de PCS lavado molido a 50°C, 55°C, y 60°C.

Xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 fue añadida a niveles diferentes (1,25%, 2,5%, 5%, 10%, y 20%) a una carga constante de la composición enzimática a alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa).

Figuras 4A e 4B muestran una comparación de composición enzimática de alta temperatura mejorada que contiene xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 (60°C) con celulasa basada en *Trichoderma reesei* XCL-533 (50°C) en la hidrólisis de PCS lavado (A) y sin lavar (B).

Definiciones

[0021] Enzima hemicelulolítica o hemicelulasa: el término "enzima hemicelulolítica" o "hemicelulasa" significa una o más (varias) enzimas que hidrolizan un material hemicelulósico.

Ver, por ejemplo, Shallom, D. and Shoham, Y. Microbial hemicellulases.

Current Opinion In Microbiology, 2003, 6(3): 219-228).

Hemicelulasas son componentes clave en la degradación de biomasa vegetal.

Ejemplos de hemicelulasas incluyen, pero de forma no limitativa, una esterasa de acetilmanano, una esterasa de acetixileno, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronoil, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa.

Los sustratos de estas enzimas, las hemicelulosas, son un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados y lineales que están ligados vía enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa en la pared celular vegetal, reticulándolos en una red robusta.

Las hemicelulosas son también de manera covalente fijadas a lignina, formando junto con celulosa una estructura altamente compleja.

La estructura variable y la organización de hemicelulosas requiere la acción convenida de muchas enzimas para su degradación completa.

Los módulos catalíticos de hemicelulasas son bien glicósido hidrolasas (GHs) que hidrolizan enlaces glicosídicos, o esterasas de carbohidrato (CEs), que hidrolizan enlaces de éster de acetato o grupos laterales de ácido ferúlico.

Estos módulos catalíticos, basados en homología de su secuencia primaria, se puede asignar en familias GH y CE marcadas por números.

Algunas familias, con pliegue similar total, pueden ser además reagrupadas en clanes, marcados alfabéticamente (por ejemplo, GH-A).

Una clasificación más informativa y actualizada de estas y otras enzimas activas de carbohidrato está disponible en la base de datos de enzimas activas de carbohidrato (CAZy).

Actividades enzimáticas hemicelulolíticas se pueden medir según Ghose and Bisaria, 1987, Pure & Appl. Chem. 59: 1739-1752.

[0022] Actividad de degradación de xilano o actividad xilanolítica: el término "actividad de degradación de xilano" o "actividad xilanolítica" significa una actividad biológica que hidroliza material que contiene xilano.

Los dos métodos básicos para medir actividad xilanolítica incluyen: (1) medición de la actividad xilanolítica total, y (2) medición de las actividades xilanolíticas individuales (por ejemplo, endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, acetilxilano esterasas, feruloilo esterasas, y esterasas de alfa-glucuronoil).

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

[0023] Actividad de degradación de xilano total se puede medir por determinación de los azúcares reductores formados de varios tipos de xilano, incluyendo, por ejemplo, espelta de avena, madera de haya, y xilanos de madera de alerce, o por determinación fotométrica de fragmentos de xilano teñidos liberados de varios xilanos de manera covalente teñidos.

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

Actividad de xilanasa puede también ser determinada con 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 0,01% Tritón X-100 y 200 mM pH de búfer de fosfato sódico 6 a 37°C.

Una unidad de actividad de xilanasa es definida como 1,0 μ mol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6 de 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 200 mM búfer de pH 6 de fosfato sódico.

[0024] Para fines de la presente invención, actividad de degradación de xilano se determina por medición del aumento en la hidrólisis de xilano de madera de abedul Sigma Chemical Co., Inc., St.

Louis, MO, EE.UU) por enzima(s) que degrada xilano bajo las siguientes condiciones típicas: 1 ml reacciones, 5 mg/ml sustrato (sólidos totales), 5 mg de xilanolítica proteína/g de sustrato, 50 mM pH de acetato sódico 5,50°C, 24 horas, análisis de azúcar usando ensayo de hidrácida de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) como se describe por Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal.

Biochem 47: 273-279.

[0025] Xilanasa: el término "xilanasas" significa una 1,4-beta-D-xilano-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.

Para fines de la presente invención, actividad de xilanasa se determina con 0,2% AZCL-arabinoxilano (trigo; (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Ireland)) como sustrato en 200 mM pH de fosfato sódico 6 conteniendo 0,01% TRITON® X-100 a 37°C.

Una unidad de actividad de xilanasa es definida como 1,0 µmol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6 de 0,2% AZCL-arabinoxilano en 0,2 M pH de fosfato sódico 6,0 conteniendo 0,01% TRITON® X-100.

[0026] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, y al menos 100% de la actividad de celobiohidrolasa del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

[0027] Enzima celulolítica o celulasa: el término "enzima celulolítica" o "celulasa" significa una o más (varias) enzimas que hidrolizan un material celulósico.

Tales enzimas incluyen endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s), beta-glucosidasa(s), o combinaciones de las mismas. Los dos métodos básicos para medir actividad celulolítica incluyen: (1) medición de la actividad celulolítica total, y (2) medición de las actividades celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas) como revisadas en Zhang *et al.*, Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481.

Actividad celulolítica total es normalmente medida usando sustratos insolubles, incluyendo papel de filtro Whatman N°1, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa algal, algodón, lignocelulosa pretratada, etc. El ensayo de actividad celulolítica total más común es el ensayo de papel de filtro que usa papel de filtro Whatman N°1 como el sustrato.

El ensayo fue establecido por el International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

[0028] Para fines de la presente invención, actividad enzimática celulolítica se determina por medición del aumento en la hidrólisis de un material celulósico por enzima(s) celulolítica bajo las condiciones siguientes: 1-20 mg de proteína de enzima celulolítica/g de celulosa en PCS durante 3-7 días a 50°C en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína enzimática celulolítica.

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

[0029] Endoglucanasa: el término "endoglucanasa" significa una endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucan 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.4), que cataliza endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados químicos de la celulosa (tales como carboximetilcelulosa y celulosa de hidroxietilo), liquenina, enlaces beta-1,4 en glucanos beta-1,3 mezclados tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal que contiene componentes celulósicos.

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

Para fines de la presente invención, la actividad de endoglucanasa es determinada usando el carboximetilo celulosa (CMC) como sustrato según el procedimiento de Ghose, 1987, Pure y Appl. Chem. 59: 257-268, a pH 5,40°C.

[0030] Celobiohidrolasa: el término "celobiohidrolasa" significa una celobiohidrolasa de 1,4-beta-D-glucano (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier glucosa beta-1,4-enlazada que contiene polímero, que libere celobiosa de las extremidades de reducción o no-reducción de la cadena (Teeri, 1997, Crystalline cellulose degradation: New insight into the función of cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology 15: 160-167; Teeri *et al.*, 1998, Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178).

Para fines de la presente invención, actividad de celobiohidrolasa se determina según los procedimientos descritos por Lever *et al.*, 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh *et al.*, 1982, FEBS Letters, 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeysens, 1985, FEBS Letters, 187: 283-288; and Tomme *et al.*, 1988, Eur. J. Biochem. 170: 575-581.

En la presente invención, el método de Lever *et al.* se puede emplear para valorar hidrólisis de celulosa en rastrojos de maíz, mientras los métodos van Tilbeurgh *et al.* y Tomme *et al.* pueden utilizarse para decidir la actividad de celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente, 4-metilumbeliferil-β-D-lactósido.

[0031] Beta-glucosidasa: el término "beta-glucosidasa" significa una glucohidrolasa de beta-D-glucósido (E.C. 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no-reducida terminal con la liberación de beta-D-glucosa.

Para fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi *et al.*, 2002, Extracellular beta-D-glucosidase from Chaetomium thermophilum var. coprophilum: production, purification and some biochemical properties, J. Basic Microbiol. 42: 55-66.

Una unidad de beta-glucosidasa es definida como 1,0 μ mol de anión de p-nitrofenolato producido por minuto a 25°C, pH 4.8 de 1 mM p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato en 50 mM citrato sódico que contiene 0,01% TWEEN® 20.

5 [0032] Polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica: el término "polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica" significa un polipéptido GH61 que cataliza el realce de la hidrólisis de un material celulósico por enzima con actividad celulolítica.

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

15 En un aspecto preferido, una mezcla de CELLUCLAST® 1,5L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) en presencia de 2-3% de peso de proteína total beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (de forma recombinante producida en el *Aspergillus oryzae* según WO 02/095014) o 2-3% de peso de proteína total beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (de forma recombinante producida en el *Aspergillus oryzae* como se describe en WO 2002/095014) de carga de proteína de celulasa se usa como la fuente de la actividad celulolítica.

20 [0033] Los polipéptidos GH61 que tienen actividad de mejora celulolítica mejoran la hidrólisis de un material celulósico catalizado por enzima con actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis preferiblemente al menos 1,01 pliegue, más preferiblemente al menos 1,05 pliegue, más preferiblemente al menos 1,10 pliegue, más preferiblemente al menos 1,25 pliegue, más preferiblemente al menos 1,5 pliegue, más preferiblemente al menos 2 pliegues, más preferiblemente al menos 3 pliegues, más preferiblemente al menos 4 pliegues, más preferiblemente al menos 5 pliegues, aún más preferiblemente al menos 10 pliegues, y de la forma más preferible al menos 20 pliegues.

30 [0034] Hidrolasa de glicósido de familia 10: el término "hidrolasa de glicósido de familia 10" o "GH10" significa un polipéptido perteneciente la familia glicósido hidrolasa 10 según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat B., and Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

35 [0035] Hidrolasa de glicósido de familia 61: el término "hidrolasa de glicósido de familia 61" o "familia GH61" o "GH61" significa un polipéptido perteneciente a la familia glicósido hidrolasa 61 según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat B., and Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

40 [0036] Beta-xilosidasa: el término "beta-xilosidasa" significa una xilohidrolasa de beta-D-xilósido (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exohidrólisis de beta (1→4)-xilooligosaccharidas cortas, para eliminar residuos de d-xilosa sucesiva de los terminales no-reducidos.

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

[0037] Acetilxilano esterasa: el término "acetilxilano esterasa" significa una carboxilesterasa (EC 3.1.1.72) que cataliza la hidrólisis de grupos de acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de alfa-naptil, y acetato de p-nitrofenilo.

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

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

55 [0038] Feruloil esterasa: el término "feruloil esterasa" significa una 4-hidroxi-3-metoxicinamoil- hidrolasa de azúcar (EC 3.1.1.73) que cataliza la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoil (feruloilo) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinoso en sustratos "naturales, para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato).

Feruloil esterasa es también conocida como esterasa de ácido ferúlico, esterasa de hidroxicinamoilo, FAE-III, hidrolasa de éster de cinnamoilo, FAEA, cinnAE, FAE-I, o FAE-II.

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

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

65 [0039] Alfa-glucuronidasa: el término "alfa-glucuronidasa" significa una glucuronohidrolasa de alfa-D-glucosiduronato (EC 3.2.1.139) que cataliza la hidrólisis de un alfa-D-glucuronósido para D-glucuronato y un alcohol.

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

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

5 [0040] Alfa-L-arabinofuranosidasa: el término "alfa -L-arabinofuranosidasa" significa una arabinofuranohidrolasa de alfa-L-arabinofuranosida (EC 3.2.1.55) que cataliza la hidrólisis de residuos de terminales alfa-L-arabinofuranosida no reductores en alfa-L-arabinósidos.

10 La enzima actúa en alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contienen (1,3)- y/o (1,5)-enlaces, arabinoxilanas, y arabinogalactanos.

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

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

20 [0041] Material celulósico: el material celulósico puede ser cualquier material que contiene celulosa. El polisacárido predominante en la pared celular primaria de biomasa es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa, y el tercero es pectina.

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

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

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

30 Hemicelulosas normalmente enlazan de hidrógeno para celulosa, al igual que a otras hemicelulosas, que ayudan a estabilizar la matriz de pared celular.

[0042] La celulosa es generalmente descubierta, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascós, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, derivaciones, y madera de árboles.

35 El material celulósico puede ser, pero no es limitado a, material herbáceo, residuo agrícola, residuo de silvicultura, residuos sólidos municipales, papel de desecho, y pulpa y residuo de fábrica de papel (ver, por ejemplo, Wiselogel *et al.*, 1995, in Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp.105-118, Taylor & Francis, Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719; Mosier *et al.*, 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23-40, Springer-Verlag, New York).

40 Es entendido aquí que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

En un aspecto preferido, el material celulósico es lignocelulosa.

45 [0043] En un aspecto, el material celulósico es material herbáceo.

En otro aspecto, el material celulósico es residuo agrícola.

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

En otro aspecto, el material celulósico es residuo sólido municipal.

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

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

[0044] En otro aspecto, el material celulósico es rastrojos de maíz.

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

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

55 En otro aspecto, el material celulósico es piel de naranja.

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

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

En otro aspecto, el material celulósico es pasto varilla.

En otro aspecto, el material celulósico es miscanthus.

60 En otro aspecto, el material celulósico es bagazo.

[0045] En otro aspecto, el material celulósico es celulosa microcristalina.

En otro aspecto, el material celulósico es celulosa bacteriana.

En otro aspecto, el material celulósico es celulosa algal.

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

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

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

[0046] El material celulósico se puede utilizar como es o se puede someter a pretratamiento, que usa métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en este caso.

5 En un aspecto preferido, el material celulósico es pretratado.

[0047] Rastrojos de maíz pretratados: el término "PCS" o "rastrojos de maíz pretratados" significa un material celulósico derivado de forraje de maíz por tratamiento con calor y ácido sulfúrico de diluido.

10 [0048] Material que contiene xilano: el término "material que contiene xilano" es definido aquí como cualquier material que comprende un polisacárido de pared de célula de planta con un esqueleto de residuos de xilosa enlazada beta-(1-4).

Xilanos de plantas terrestres son heteropolímeros que poseen un esqueleto beta-(1-4)-D-xilopiranosos, que se ramifica por cadenas de carbohidrato corto.

15 Comprenden ácido D-glucurónico o su éter de 4-O-metilo, L-arabinosa, y/o varios oligosacáridos, compuesto por D-xilosa, L-arabinosa, D- o L-galactosa, y D-glucosa.

Polisacáridos tipo xilano se pueden dividir en homoxilanos y heteroxilanos, que incluyen glucuronoxilanos, (arabino)glucuronoxilanos, (glucurono)arabinoxilanos, arabinoxilanas, y heteroxilanos complejos. Ver, por ejemplo, Ebringerova *et al.*, 2005, *Adv. Polym. Sci.* 186: 1-67.

20 [0049] En los métodos de la presente invención, cualquier material que contiene xilano puede ser utilizado. En un aspecto preferido, el material que contiene xilano es lignocelulosa.

[0050] Aislado o purificado: los términos "purificado" o "aislado" significan un polipéptido o polinucleótido que es quitado de como mínimo un componente con el cual es naturalmente asociado.

25 Por ejemplo, un polipéptido puede ser al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro, o al menos 95% puro, como determinado por SDS-PAGE, y un polinucleótido puede ser al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro, o al menos 95% puro, como determinado por electroforesis de agarosa.

[0051] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su traducción siguiente de forma final y cualquier modificación postraduccional, tales como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 20 a 398 de identidad de SEC ID n° 2 basado en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6) que predice que aminoácidos 1 a 19 de identidad de SEC ID n° 2 son un péptido señal.

Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos de más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresado por el mismo polinucleótido.

40 [0052] Secuencia que codifica polipéptido maduro: el término "secuencia que codifica polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de xilanasas.

En un aspecto, la secuencia que codifican polipéptido maduro son nucleótidos 58 a 1194 de SEC ID n.º: 1 basados en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que predice que nucleótidos 1 a 57 de SEC ID n.º: 1 codifican un péptido señal.

45 En otro aspecto, la secuencia que codifica polipéptido maduro es la secuencia de ADN gnómica de nucleótidos 58 a 1194 de SEC ID n.º: 1.

[0053] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad de secuencia".

50 [0054] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior.

55 Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

El resultado de Needle etiquetado "longest identity" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

60
$$\frac{\text{(Residuos idénticos} \times 100)}{\text{(Longitud de alineamiento} - \text{Número total de espacios en alineamiento)}}$$

[0055] Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferiblemente versión 3.0.0 o más tarde.

65

Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4)

El resultado de Needle etiquetado "longest identity" (obtenido utilizando la opción - nobrief) se usa como el identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

5
$$\frac{(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100)}{(\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de espacios en alineamiento})}$$

10 [0056] Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (diferentes) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de xilanasas. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 320 residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos 340 residuos de aminoácidos o al menos 360 residuos de aminoácidos.

15 [0057] Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (diferentes) nucleótidos eliminados del y/o extremo de una secuencia que codifica polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de xilanasas. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 960 nucleótidos, por ejemplo, al menos 1020 nucleótidos o al menos 1080 nucleótidos.

20 [0058] Variante alélica: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones. Mutaciones de gen pueden ser silenciosas (ningun cambio en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

25 [0059] Secuencia codificante: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante son generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y extremidades con un codón de terminación tales como TAA, TAG, y TGA. La secuencia codificante puede ser un polinucleótido ADN, ADNc, sintético, o recombinante.

30 [0060] ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se pueden preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura empalmada obtenida de una célula eucariota. Carece de secuencias de intrones que pueden estar presente en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN inicial primario es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

35 [0061] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien uni o bicatenario, que es aislado de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos en cierto modo de ácidos nucleicos que de otro modo no existirían en la naturaleza o que son sintético. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimos del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

40 [0062] Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifican un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativa o extranjero entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia líder de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traslacional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con motivo de introducir ligamento facilitador de sitios de restricción específico de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica un polipéptido.

45 [0063] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de un polinucleótido tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificadora

50 [0064] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0065] Vector de expresión: el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y es operativamente enlazado para nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

5 [0066] Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo celular que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similares con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.
El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante replicación.

10 [0067] Variante: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de xilanasas que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección de uno o más (varios) residuos de aminoácidos a una o más (varias) posiciones.

15 Una sustitución significa una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de uno o más (varios) aminoácidos, por ejemplo, 1-5 aminoácidos, adyacentes para un aminoácido que ocupa una posición.

20 Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de xilanasas

[0068] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de xilanasas seleccionada del grupo consistente en:

- 25 (a) un polipéptido con al menos 65% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;
(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprenden al menos 65% identidad de secuencia a la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; y
(c) una variante que comprende una sustitución, delección, y/o inserción de 1-5 aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

30 [0069] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 de al menos 65%, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad de xilanasas.

35 En un aspecto, los polipéptidos difieren por no más de cinco aminoácidos, por cuatro aminoácidos, por tres aminoácidos, por dos aminoácidos, y por un aminoácido del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

[0070] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2.

40 En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 20 a 398 de SEC ID n.º: 2.

[0071] La presente invención también se refiere a un polipéptido de la invención que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2; o un fragmento del mismo con actividad de xilanasas.

45 [0072] La invención también se refiere a un polipéptido de xilanasas, que se codifica por el polinucleótido contenido en plasmídico pTF12Xyl170 que es contenido en E. coli NRRL B-50309.

[0073] El polinucleótido de SEC ID n.º: 1 o una subsecuencia del mismo, al igual que la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2 o un fragmento de la misma, se puede utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos de codificación de ADN con actividad de xilanasas de cepas de diferente géneros o especies según métodos bien conocido en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADN genómico o del género o especies de interés, siguiendo procedimientos de estándar de hibridación Southern, identificando y aislando el gen correspondiente ahí.

50 Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser al menos 14, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos en la longitud.

Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos es al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud.

60 Tanto ADN como ARN sondas pueden usarse.

Las sondas son típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con biotina ³²P, ³H, ³⁵S, o avidina).

[0074] Un ADN o biblioteca genómico obtenido a partir de tales otras cepas se pueden seleccionar para ADN que hibrida con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de xilanasas.

65

Genómico u otro ADN de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poli(acrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación.

ADN de las bibliotecas o el ADN separado se pueden transferir e inmovilizar en la nitrocelulosa u otro material de portador adecuado.

- 5 Para identificar un clon o ADN que es homólogo a SEC ID n.º: 1 o a una subsecuencia de la misma, el material portador es preferiblemente usado en una hibridación de Southern.

[0075] Hibridación indica que el polinucleótido hibridiza a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con SEC ID n.º: 1; la secuencia que codifican de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; la secuencia de ADN genómico de la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; su cadena complementaria en toda su longitud; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de muy baja a altísima.

Moléculas a la que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica.

- 15 [0076] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADN genómico de la misma.

En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID n.º: 2 o el polipéptido maduro del mismo; o un fragmento del mismo.

En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADN genómico de la misma.

- 20 En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es el polinucleótido contenido en plasmídico pTF12Xyl170 que se contiene en *E. coli* NRRL B-50309, donde el polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de xilanasas.

En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la región de codificación de polipéptido maduro contenida en plasmídico pTF12Xyl170 que se contiene en *E. coli* NRRL B-50309.

- 25 [0077] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia de muy baja a altísima son definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y bien 25% formamida para astringencias muy bajas y bajas, 35% formamida para astringencias media y medio altas, o 50% formamida para astringencias altas y altísimas, siguiendo procedimientos de hibridación Southern estándar durante de 12 a 24 horas óptimamente.

- 30 El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% SDS a 45°C (astringencia muy baja), a 50°C (astringencia baja), a 55°C (astringencia media), a 60°C (astringencia media alta), a 65°C (astringencia alta), y a 70°C (astringencia altísima).

[0078] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación e hibridación en alrededor de 5°C a aproximadamente 10°C por debajo del T_m calculado utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M pH Tris-HCl 7,6 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM ATP, y 0,2 mg de levadura ARN por ml siguiendo procedimientos de hibridación Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

- 40 El material portador es finalmente lavado una vez en 6X SSC más 0,1% SDS para 15 minutos y dos veces cada para 15 minutos utilizando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo del T_m calculado.

[0079] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de xilanasas codificada por polinucleótidos con una identidad de secuencia para la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADN genómico de la misma de al menos 65%, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%.

- 50 [0080] La presente invención también se refiere a variantes que comprenden una sustitución, delección, y/o inserción de 1-5 aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

Preferiblemente, los cambios aminoácidos son de una naturaleza menor, esto es sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al plegado y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a cinco ácidos de amino; amino pequeño o extensiones terminadas carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido de enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación por carga de red de cambio u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0081] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, New York.

Los intercambios más frecuentes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

- 65

[0082] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos son alteradas.

Por ejemplo, cambios aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similar.

5 [0083] Aminoácidos esenciales en un polipéptido original se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085).

10 En la técnica anterior, mutaciones de alanina única se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de xilanasas para identificar residuos de aminoácidos que son críticos a la actividad de la molécula. Ver también, Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708.

El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo.

15 Ver, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64.

Los identidades de aminoácidos esenciales también pueden ser inferidos de análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con el polipéptido original.

20 [0084] Sustituciones, deleciones, y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descrito por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; or WO 95/22625.

25 Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (e.g., Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; U.S. Patent No. 5,223,409; WO 92/06204, y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46: 145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7: 127).

[0085] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos clonados mutagenizados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896).

30 Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y ordenar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

35 [0086] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 no es más de 5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5.

[0087] Un polipéptido puede ser polipéptido híbrido donde una porción de un polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término de una porción de otro polipéptido.

40 [0088] Un polipéptido puede ser un polipéptido fusionado o polipéptido de fusión divisible donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido de la presente invención.

Un polipéptido fusionado se produce por fundición de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención.

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

Proteínas de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde fusiones se crean postraduccionalmente (Cooper *et al.*, 1993, *EMBO J.* 12: 2575-2583; Dawson *et al.*, 1994, *Science* 266: 776-779).

[0089] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos.

50 En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando dos polipéptidos.

Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin *et al.*, 2003, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3: 568-576; Svetina *et al.*, 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; and Contreras *et al.*, 1991, *Biotechnology* 9: 378-381; Eaton *et al.*, 1986, *Biochemistry* 25: 505-512; Collins-Racie *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 982-987; Carter *et al.*, 1989, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6: 240-248; and Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48.

Fuentes de polipéptidos con actividad de xilanasas

60 [0090] Un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención se puede obtener de microorganismos de cualquier género.

Para fines de la presente invención, el término "obtener de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde el polinucleótido de la fuente ha sido insertado.

65 En un aspecto, el polipéptido obtenido de una fuente dada es secretada extracelularmente.

[0091] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano.

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

[0092] En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*.

[0093] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi subesp. Zooepidemicus*.

[0094] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans*.

[0095] El polipéptido también puede ser un polipéptido fúngico.

Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*; o un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizofilum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria*.

[0096] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis*.

[0097] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *microspora de Thielavia*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0098] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido *Trichophaea saccata* con actividad de xilanasas.

En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido *Trichophaea saccata* CBS 804.70 con actividad de xilanasas, por ejemplo, el polipéptido que comprende el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

[0099] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que son conocidos.

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

[0100] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0101] El polipéptido se puede identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos del natural aislados (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas arriba.

Técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego ser obtenido seleccionando de manera similar un ADN o biblioteca genómico de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado.

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

Polinucleótidos

10 [0102] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención.

[0103] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de los mismos.

15 La clonación de los polinucleótidos de tal ADN genómico puede ser efectuadas, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa bien conocida (PCR) o seleccionando anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas.

Ver, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York.

20 Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tal como (LCR) de reacción en cadena de la ligasa, (LAT) de transcripción activada de ligamiento y amplificación basada en polinucleótido (NASBA) pueden ser utilizados.

Los polinucleótidos se pueden clonar de una cepa de *Trichophaea*, o un organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región que codifica polipéptido del polinucleótido.

25 [0104] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en polinucleótidos con un grado de identidad de secuencia a la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADN genómico de al menos 65%, por ejemplo, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que codifica un polipéptido con actividad de xilanasasa.

30 [0105] Modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido.

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

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

La variante se puede construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADN genómico de la misma, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o introduciendo sustituciones de nucleótido que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso de codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o introduciendo sustituciones de nucleótido que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente.

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

45 [0106] Polipéptidos de codificación de polinucleótidos aislados de la presente invención pueden hibridar bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas, o condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia que codifican de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, (ii) o la secuencia de ADN genómico de la secuencia que codifican el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de la misma (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define aquí.

50 [0107] En un aspecto, el polinucleótido comprende o consiste en SEC ID n.º: 1, la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, o la secuencia contenida en plasmidico pTF12Xyl170 que se contiene en *E. coli* NRRL B-50309, o una subsecuencia de SEC ID n.º: 1 que codifica un fragmento de SEC ID n.º: 2 con actividad de xilanasasa, tal como el polinucleótido de nucleótidos 58 a 1194 de SEC ID n.º: 1.

Constructos de ácidos nucleicos

60 [0108] Constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención pueden ser operativamente enlazados para una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

65 [0109] Un polinucleótido se puede manipular en una variedad de formas para proporcionar la expresión del polipéptido.

Manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión.

Las técnicas para modificación de polinucleótidos usando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

5 [0110] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados, e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogo a la célula huésped.

15 [0111] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), del gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus*, operón de *E. coli lac*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), así como promotores *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25).
20 Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" in Gilbert *et al.*, 1980, Scientific American, 242: 74-94; and in Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

25 [0112] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* o glucoamilasa de *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa de *Trichoderma reesei* I, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa de *Trichoderma reesei* II, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en *Aspergilli* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de gen que codifica una triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de la alfa-amilasa neutra de gen que codifica en el *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en el *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.

40 [0113] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), deshidrogenasa de dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*.
45 Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0114] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, que se reconoce por una célula huésped para terminar transcripción.
50 La secuencia terminadora es operativamente enlazada al término de 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0115] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
55

[0116] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
60 Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0117] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, cuando se transcribe una región no traducida de un ARNm que es importante para traducción por la célula huésped.
65 La secuencia líder es operativamente enlazada al 5'-terminus del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula huésped elegida puede ser utilizada.

[0118] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

5 [0119] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y deshidrogenasa de deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

10 [0120] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al término de 3' del polinucleótido y, cuando transcrito, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina para ARNm transcrito.
Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped elegida puede ser utilizada.

15 [0121] Secuencias de poliadenilación preferida para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

20 [0122] Secuencias de poliadenilación útil para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

[0123] La secuencia de control también puede ser una región que codifica el péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-término de un polipéptido y dirige el polipéptido en la vía secretora de la célula.
El 5'-final de la secuencia que codifica el polinucleótido puede intrínsecamente contener una secuencia que codifica el péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido.

25 Alternativamente, el 5'-final de la secuencia codificadora puede contener una secuencia que codifica el péptido señal que es extranjera a la secuencia codificadora.

La secuencia que codifica el péptido señal foráneo se puede requerir cuando la secuencia codificadora naturalmente no contiene una secuencia que codifica del péptido señal.

30 Alternativamente, la secuencia que codifica el péptido señal foráneo puede sencillamente reemplazar la secuencia que codifica el péptido señal natural para mejorar secreción del polipéptido.

Sin embargo, cualquier secuencia que codifica el péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped elegida puede ser utilizada.

35 [0124] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para Bacillus amilasa maltogénica de NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), y *Bacillus subtilis* *prsA*.

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

40 [0125] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

45 [0126] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

50 [0127] La secuencia de control también puede ser una secuencia que codifica el propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-término de un polipéptido.

El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos).

Un propolipéptido es generalmente inactivo y se pueden convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido.

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

60 [0128] Donde ambos péptido señal y secuencias de propéptido están presentes en el N-término de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al N-término de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situada junto al N-término de la secuencia de propéptido.

[0129] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido relativamente al crecimiento de la célula huésped.

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

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

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

En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de *Aspergillus oryzae* TAKA alfa-amilasa, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser utilizados.

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

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

En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.

10

Vectores de expresión

[0130] Vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traslacional son útiles.

15 Los varios nucleótido y secuencias de control se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que pueden incluir uno o más (varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios.

Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar por inserción del polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia en un vector apropiado para la expresión.

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

[0131] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o viral) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar expresión del polinucleótido.

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

El vector puede ser un plásmido lineal o cerrado circular.

30 [0132] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como un entidad extracromosómico, la replicación del cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.

El vector puede contener cualquier medio para autorreplicación de aseguración.

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

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

[0133] El vector contiene preferiblemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, modificadas, transducidas, o similar.

40 Un marcador seleccionable es un gen el producto del cual proporciona biocida o resistencia vírica, resistencia para metales pesados, prototrofia para auxótrofos, y similar.

[0134] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como ampicilina, cloranfenicol, canamicina, o resistencia de tetraciclina.

Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3.

Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitrilina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos.

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

[0135] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en el independiente celular del genoma.

55 [0136] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia que codifica el polinucleótido del polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por homólogos o recombinación no-homóloga.

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

Para aumentar la probabilidad de integración a una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10.000 pares de bases, 400 a 10.000 pares de bases, y 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un grado alto de identidad de secuencia a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga.

60

65

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

Además, los elementos integracionales pueden ser no codificantes o que codifican polinucleótidos.

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

5 [0137] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo al vector replicar autónomamente en la célula huésped en cuestión.

El origen de replicación puede ser cualquier replicación autónoma de mediación de replicador plasmídico que funciona en una célula.

10 El término "origen de replicación" o "replicador plasmídico" significa un polinucleótido que habilita a un plásmido o vector replicar *in vivo*.

[0138] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 replicación de permiso en el *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1
15 permitiendo replicación en el *Bacillus*.

[0139] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el 2 origen de micra de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

20 [0140] Ejemplos de orígenes de replicación útil en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883).

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

25 [0141] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar producción de un polipéptido.

Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido por integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y copias así adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar mediante cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.
30

[0142] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construcción de los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).
35

Células huésped

40 [0143] Células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado para una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención son también útiles.

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

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

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

50 [0144] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0145] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa.

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

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

[0146] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* incluyendo, pero no limitado a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.
60

[0147] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* incluyendo, pero no limitado a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi subesp. Zooepidemicus*.
65

[0148] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* incluyendo, pero no limitado a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

5 [0149] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), por electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278).

10 La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (see, e.g., Dower *et al.*, 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145).

15 La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplasto y electroporación (ver, por ejemplo, Gong *et al.*, 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier *et al.*, 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (see, e.g., Burke *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294).

20 La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, efectuarse por electroporación (ver, por ejemplo, Choi *et al.*, 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo and Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57).

25 La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede, por ejemplo, efectuarse por competencia natural (ver, por ejemplo, Perry and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, (see, e.g., Catt and Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), por electroporación (ver, por ejemplo, Buckley *et al.*, 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436).

Sin embargo, cualquier método conocido en la técnica para introducción de ADN en una célula huésped puede ser usado.

30 [0150] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta, o fúngica.

[0151] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye el Ascomycota de fila, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como definido por Hawksworth *et al.*, In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que la Oomycota (como citada en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, page 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

40 [0152] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascosporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes).

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

45 [0153] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia* tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

50 [0154] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como definido por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

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

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

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

60 [0155] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaportia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizophium*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

65 [0156] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera*, *adusta* *Ceriporiopsis*, *aneirina* *Ceriporiopsis*, *caregiea* *Ceriporiopsis*, *gilvescens* *Ceriporiopsis*,

5 *pannocinta Ceriporiopsis, rivulosa Ceriporiopsis, subrufa Ceriporiopsis, subvermispora Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, hirsutus Coriolus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, radiata Phlebia, eryngii Pleurotus, Thielavia terrestris, villosa Trametes, versicolor*
 10 *Trametes, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, o Trichoderma viride.*

[0157] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso implicando formación de protoplasto, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular en cierto modo conocida de por sí.
 15 Procedimientos adecuados para transformación de *Aspergillus* y células huésped de *Trichoderma* son descritos en EP 238023, Yelton *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474, and Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Métodos adecuados para transformación de especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156, and WO 96/00787.
 20 Levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por BBecker and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, J. Bacteriol. 153: 163; and Hinnen *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

25 Métodos de producción

[0158] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
 30 La célula puede ser del género *Trichophaea*, de las especies, *Trichophaea saccata* o es *Trichophaea saccata* CBS 804.70.

[0159] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivo de una célula huésped que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
 35

[0160] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, y fermentación de escala pequeña o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, lote, lote alimentado, o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido ser expresado y/o aislado.
 40 El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprenden fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, que usa procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection).
 45 Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, se puede recuperar de lisatos de célula.

[0161] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos.
 50 Estos métodos de detección pueden incluir uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para decidir la actividad del polipéptido.

[0162] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocido en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

[0163] El polipéptido se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatoenfoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.
 60

[0164] En un aspecto alternativo, el polipéptido no es recuperado, sino que una célula huésped de la expresión de la presente invención del polipéptido se usa como una fuente del polipéptido.
 65

Plantas

- 5 [0165] La presente invención también se refiere a plantas aisladas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal, con el polipéptido de la invención.
 La invención también se refiere a un método para producir el polipéptido de la invención que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
 La planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal comprende un polinucleótido aislado de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables.
 10 La invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal con el polipéptido de la invención.
 El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de planta.
 Alternativamente, la planta o parte de planta con el polipéptido se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o alimentación, por ejemplo, valor nutricional de mejora, palatabilidad, y propiedades reológicas, o para
 15 destruir un factor antinutritivo.
- [0166] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (un dicot) o monocotiledónea (un monocot).
 Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de prados (hierba azul, *Poa*), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, tal como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y (mijo) maíz.
 20
- [0167] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como coliflor, semilla de colza, y el organismo de modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.
 25
- [0168] Ejemplos de partes de planta son vástago, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas.
 30 Compartimentos de célula vegetal específica, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma son también consideradas una parte de planta.
 Además, cualquier célula vegetal, sea cual sea el origen de tejido, se considera una parte de planta.
 Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aislada para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de
 35 semillas.
- [0169] También se incluye dentro del campo de la presente invención la descendencia de tales plantas, partes de planta, y células vegetales.
 40
- [0170] La planta transgénica o expresión de célula vegetal de un polipéptido se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En breve, la planta o célula vegetal se construye por incorporación de uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido en el genoma de huésped de planta o genoma de cloroplasto y propagando la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.
 45
- [0171] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de planta de elección.
 Además, el constructo de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para identificación de células huésped en que el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para introducción de la construcción en la planta en cuestión (el último depende del método de introducción de ADN usado).
 50 [0172] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o tránsito, es determinada, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo se desea expresar el polipéptido.
 Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de fase o tejido, y el producto génico puede ser enfocado a un tejido específico o parte de planta tales como semillas u hojas.
 55 Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.
- [0173] Para expresión constitutiva, el 35S-CaMV, la ubiquitina-1 de maíz, y el promotor de actina de arroz 1 se pueden utilizar (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294; Christensen *et al.*, 1992, *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689; Zhang *et al.*, 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165).
 60 Promotores específicos a un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos destino de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards and Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos destino metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor de albúmina de arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida
 65

de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, J. Plant Physiol. 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo de aceite de semilla (Chen *et al.*, 1998, Plant Cell Physiol. 39: 935-941), la proteína de almacenamiento *napA* promotor de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772.

5 Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor de *rbcS* de arroz o tomate (Kyojuka *et al.*, 1993, Plant Physiol. 102: 991-1000), el promotor de gen de metiltransferasa de adenina de virus de chlorella (Mitra and Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26: 85-93), el promotor *aldP* de gen de arroz (Kagaya *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet. 248: 668-674), o un promotor inducible dañado como el promotor de patata *pin2* (Xu *et al.*, 1993, Plant Mol. Biol. 22: 573-588).

10 Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tal como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducido por sustancias exógenamente aplicadas que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de planta tales como etileno, ácido abscísico, y ácido giberélico, y metales pesados.

[0174] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir expresión más alta de un polipéptido en la planta.

Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y el polinucleótido que codifica un polipéptido.

Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra*, revelan el uso del primer intrón del gen de actina de arroz 1 para mejorar expresión.

20 [0175] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponible en la técnica.

[0176] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada de virus, microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística, y electroporación (Gasser *et al.*, 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, Nature 338: 274).

[0177] Actualmente, transferencia de gen mediado por *Agrobacterium tumefaciens* es el método elegido para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, ver Hooykas and Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y también pueden usarse para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación son frecuentemente usados para estas plantas.

Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es bombardeo de partícula (oro microscópico o partículas de tungsteno recubierto con el ADN transformador) de callos embrionarios o embriones de desarrollo (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, Bio/Technology 10: 667-674).

Un método alternativo para transformación de monocotiledóneas se basa en transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh *et al.*, 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428.

Métodos de transformación adicional para uso conforme a la presente divulgación incluyen aquellos descritos en patentes US Nº. 6,395,966 y 7,151,204.

[0178] Tras la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas completas según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separado o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0179] Además de transformación directa de una planta particular genotipo con una construcción preparada según la presente invención, plantas transgénicas pueden ser hechas por cruzamiento de una planta con la construcción a una segunda planta carece de la construcción.

Por ejemplo, una construcción que codifica un polipéptido se puede introducir en una variedad de planta particular por cruce, sin la necesidad de directamente transformar una planta de esta variedad dada nunca.

Por lo tanto, la presente invención abarca no solo una planta directamente regenerada de células que han sido transformadas conforme a la presente invención, sino también la descendencia de tales plantas.

55 Como se utiliza en este caso, descendencia puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada conforme a la presente invención.

Tal descendencia puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención, o una porción de un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención.

Cruzar produce la introducción de un transgén en una línea de planta por polinización cruzada de una línea de inicio con una línea de planta donante.

60 Ejemplos no limitativos de tales pasos son además articulados en la patente US nº 7,151,204.

[0180] Planta se puede generar a través de un proceso de conversión de retrocruce.

Por ejemplo, plantas incluyen plantas referidas como un retrocruce genotipo convertido, línea, innato, o híbrido.

65

[0181] Marcadores genéticos se pueden utilizar para asistir en la introgresión de uno o varios transgenes de la invención de un contexto genético a otro.

Selección asistida de marcadora ofrece ventajas con respecto a cultivo convencional en que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas.

5 Además, marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma élite en la descendencia individual de un cruce particular.

Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que de otro modo tiene un contexto genético no agronómicamente deseable se cruza con un progenitor élite se pueden utilizar marcadores genéticos para seleccionar descendencia que no solo posea la característica de interés, sino también tenga una proporción

10 relativamente grande del germoplasma deseado.

De esta manera, el número de generaciones requerido para introgresión de uno o varios rasgos en un contexto genético particular es minimizado.

[0182] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

15

Eliminación o reducción de actividad de xilanas

20

[0183] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un mutante de una célula madre, que comprende interrupción o borrado de un polinucleótido que codifica el polipéptido, o una porción del mismo, que produce la célula mutante que produce menos del polipéptido que la célula madre.

[0184] La célula mutante se puede construir al reducir o eliminar expresión del polinucleótido usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, inserciones, interrupciones, reemplazos, o deleciones.

25 En un aspecto preferido, el polinucleótido es inactivado.

El polinucleótido a ser modificado o inactivado puede ser, por ejemplo, la región de codificación o una parte de la misma esencial para la actividad, o un elemento regulador requerido para la expresión de la región de codificación.

30 Un ejemplo de tal secuencia de control o reguladora puede ser una secuencia promotora o una parte funcional de la misma, es decir, una parte que es suficiente para expresión de afectación del polinucleótido.

Otras secuencias de control para modificación posible incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, secuencia de péptido señal, terminador de transcripción, y activador transcripcional.

35

[0185] Modificación o inactivación del polinucleótido se puede realizar sometiendo la célula madre a mutagénesis y seleccionando células mutantes donde la expresión del polinucleótido ha sido reducida o eliminada.

La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, puede ser realizada, por ejemplo, usando un agente mutagenizante de sustancia química o física adecuada, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la

40 secuencia de ADN a mutagénesis generada PCR.

Además, la mutagénesis se puede realizar usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes.

[0186] Ejemplos de un agente físico o químico mutagenizante adecuado para este fin incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosguanidina (MNNG), hidroxilamina de metilo de O, ácido nitroso, metano etilo sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos de nucleótido.

45

[0187] Cuando tales agentes se usan, la mutagénesis es típicamente realizada incubando la célula madre a ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas, y cribando y/o seleccionando células mutantes que exhiben reducida o ninguna expresión del gen.

50

[0188] Modificación o inactivación del polinucleótido se puede realizar por introducción, sustitución, o eliminación de uno o más (varios) nucleótidos en el gen o un elemento regulador requerido para la transcripción o traducción de la misma.

Por ejemplo, nucleótidos se puede insertar o quitar para suponer la introducción de un codón de terminación, la eliminación del codón de inicio, o un cambio en el marco de lectura abierto.

55 Tal modificación o inactivación se puede realizar por mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis generada PCR conforme a métodos conocida en la técnica. Aunque, en principio, la modificación se puede realizar *in vivo*, es decir, directamente en la expresión de célula del polinucleótido a ser modificada, se prefiere que la modificación ser realizada *in vitro* como ejemplificado por debajo.

60

[0189] Un ejemplo de una forma conveniente para eliminar o reducir expresión de un polinucleótido se basa en técnicas de sustitución de gen, deleción génica, o interrupción génica.

Por ejemplo, en el método de interrupción génica, una secuencia de ácidos nucleicos correspondiente al polinucleótido endógeno se mutageniza *in vitro* para producir una secuencia de ácidos nucleicos defectuosa que es luego transformada en la célula madre para producir un gen defectuoso.

65 Por recombinación homóloga, la secuencia de ácidos nucleicos defectuosa reemplaza el polinucleótido endógeno.

Puede ser deseable que el polinucleótido defectuoso también codifique una etiqueta que se puede utilizar para selección de transformantes donde el polinucleótido ha sido modificado o destruido.
En un aspecto particularmente preferido, el polinucleótido se interrumpe con una etiqueta seleccionable tal como los descritos aquí.

5 [0190] La presente invención también se refiere a métodos de inhibición de la expresión de un polipéptido con actividad de xilanasasa en una célula, que comprende administración a la célula o expresión en la célula de una molécula de (ARNds) de ARN bicatenario.

10 El ARNds de la invención comprende una subsecuencia de un polinucleótido de la presente invención.
El ARNds es aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos dúplex en la longitud.

15 [0191] El ARNds puede ser un de ARN pequeño de interferencia (ARNsi) o un micro ARN (ARNmi).
En un aspecto preferido, el ARNds es ARN pequeño de interferencia (ARNsi) para transcripción de inhibición.
En otro aspecto preferido, el ARNds es micro ARN (ARNmi) para traducción inhibidora.

[0192] La presente invención también se refiere a tales moléculas (ARNds) de ARN bicatenario, que comprenden una porción de la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 para expresión de inhibición del polipéptido en una célula.

20 Mientras la presente invención no está limitada por cualquier mecanismo particular de acción, el ARNds puede introducir una célula y accionar la degradación de un (ARNss) ARN monocatenario de secuencias similares o idénticas, incluyendo ARNm endógeno.

Cuando una célula se expone a ARNds, ARNm del gen homólogo es selectivamente degradado por un proceso llamado de (ARNi) interferencia de ARN.

25 [0193] Los ARNds de la presente invención se pueden usar en la silenciación del gen.
En un aspecto, la invención proporciona métodos para selectivamente degradar ARN que utiliza un dsARNi de la presente invención.

El proceso puede ser practicado *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

30 En un aspecto, las moléculas ARNds pueden utilizarse para generar una mutación de pérdida de función en una célula, un órgano o un animal.

Métodos para la realización y uso de moléculas ARNds para selectivamente degradar ARN se conocen en la técnica; ver, por ejemplo, patentes US N.º. 6,489,127, 6,506,559, 6,511,824; y 6,515,109.

35 [0194] La presente invención se refiere además a una célula mutante de una célula madre que comprende una interrupción o delección de un polinucleótido que codifica el polipéptido o una secuencia de control de la misma o un gen que codifica silenciado del polipéptido, que produce la célula mutante que produce menos del polipéptido o ningún polipéptido en comparación con la célula madre.

40 [0195] Las células mutantes deficientes en polipéptidos son particularmente útiles como células huésped para la expresión de polipéptidos nativos y heterólogos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere además a métodos de producción de un polipéptido nativo o heterólogo, que comprende: (a) cultivo de la célula mutante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

45 El término "polipéptidos heterólogos" significa polipéptidos que no son nativos a la célula huésped, por ejemplo, una variante de una proteína nativa.

La célula huésped puede comprender más de una copia de un polinucleótido que codifica el polipéptido heterólogo o nativo.

50 [0196] Los métodos usados para cultivo y purificación del producto de interés se pueden realizar por métodos conocidos en la técnica.

[0197] Los métodos de la presente invención para producir un producto esencialmente sin xilanasasa es de interés particular en la producción de polipéptidos eucarióticos, en particular proteínas fúngicas tales como enzimas.

55 Las células deficientes en xilanasasa también se puede usar para expresar proteínas heterólogas de interés farmacéutico tales como hormonas, factores de crecimiento, receptores, y similares.

El término "polipéptidos eucarióticos" incluye no solo polipéptidos nativos, sino también aquellos polipéptidos, por ejemplo, enzimas, que han sido modificados por sustituciones de aminoácidos, delecciones o adiciones, u otras modificaciones de este tipo para mejorar actividad, termoestabilidad, tolerancia de pH y similar.

60 [0198] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto proteínico esencialmente libre de actividad de xilanasasa que se produce por un método de la presente invención.

Composiciones

65 [0199] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal polipéptido.

El término "enriquecido" indica que la actividad de celobiohidrolasa de la composición ha sido aumentado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

5 [0200] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático mayor, por ejemplo, una composición monocomponente.

Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

10 [0201] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca.

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

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

15 [0202] Ejemplos son dados por debajo de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención.

La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

20 Usos

[0203] La presente invención es también dirigida a métodos de uso los polipéptido con actividad de xilanasas, o composiciones de las mismas.

25 Los polipéptidos de la presente invención se pueden usar para degradación o conversión de material celulósico o material que contiene xilano (paredes celulares vegetales o cualquier material que contiene xilano, por ejemplo, lignocelulosa, originado de paredes de células vegetales (ver, por ejemplo, WO 2002/18561) que comprenden: tratar el material celulósico o material que contiene xilano con una composición enzimática en presencia del polipéptido de la invención.

Ejemplos de varios usos son descritos abajo.

30 La dosificación de los polipéptidos de la presente invención y otras condiciones bajo que los polipéptidos se usan se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

[0204] La degradación enzimática de un material que contiene xilano se facilita por eliminación completa o parcial de las derivaciones laterales.

35 Los polipéptidos de la presente invención pueden preferiblemente ser usados conjuntamente con otras enzimas de degradación de xilano tales como xilanasas, acetilxilano esterasas, arabinofuranosidasas, xilosidasas, feruloilo esterasas, glucuronidasas, y combinaciones de las mismas, en procesos donde material que contiene xilano debe ser degradado.

Por ejemplo, grupos de acetilo se pueden quitar por esterasas de acetilxilano; grupos de arabinosa por alfa-arabinosidasas; feruloilo grupos por feruloilo esterasas, y grupos de ácido glucurónico por alfa-glucuronidasas.

40 Los oligómeros liberados por las xilanasas, o por una combinación de xilanasas y enzimas laterales hidrolizando ramificación, puede ser además degradado para xilosa libre por beta-xilosidasas.

45 [0205] La presente invención también se refiere a métodos para degradación o conversión de un material celulósico o que contiene xilano, que comprende: tratamiento del material celulósico o que contiene xilano con una composición enzimática en la presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención.

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

50 [0206] La presente invención también se refiere a métodos para producir un producto de fermentación, que comprende: (a) sacarificación de un material celulósico o que contiene xilano con una composición enzimática en la presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención; (b) fermentación del material celulósico sacarificado o que contiene xilano con uno o más (diferentes) microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

55 [0207] La presente invención también se refiere a métodos de fermentación de un material celulósico o que contiene xilano, que comprende: fermentación del material celulósico o que contiene xilano con uno o más (varios) microorganismos fermentadores, donde el material celulósico o que contiene xilano se sacrifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención.

60 En un aspecto preferido, la fermentación del material celulósico o que contiene xilano produce un producto de fermentación.

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

65 [0208] Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para sacarificar un material celulósico o que contiene xilano para azúcares fermentables y convertir los azúcares fermentables en muchas sustancias útiles, por ejemplo,

combustible, etanol potable, y/o productos de fermentación (por ejemplo, ácidos, alcoholes, cetonas, gases, y similares).

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

[0209] El procesamiento de material celulósico o que contiene xilano según la presente invención se puede realizar usando procesos convencionales en la técnica. Además, los métodos de la presente invención se pueden implementar utilizando cualquier equipo de tratamiento de biomasa convencional configurado para operar conforme a la invención.

[0210] Hidrólisis (sacarificación) y fermentación, separadas o simultáneas, incluyen, pero de forma no limitativa, hidrólisis separada y fermentación (SHF); sacarificación simultánea y fermentación (SSF); sacarificación simultánea y cofermentación (SSCF); hidrólisis híbrida y fermentación (HHF); hidrólisis separada y co-fermentación (SHCF); hidrólisis híbrida y fermentación (HHCF); y conversión microbiana directa (DMC).

SHF usa pasos de proceso separados para primero hidrolizar enzimáticamente material celulósico o que contiene xilano para azúcares fermentables, por ejemplo, glucosa, celobiosa, celotriosa, y azúcares de pentosa (por ejemplo; xilosa), y luego fermentar los azúcares fermentables para etanol.

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

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

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

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

DMC combina los tres procesos (producción enzimática, hidrólisis, y fermentación) en uno o más pasos donde el mismo organismo se utiliza para producir las enzimas para conversión del material celulósico o que contiene xilano en azúcares fermentables y para convertir los azúcares fermentables en un producto final (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S., 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, Microbiol. Mol. Biol. Reviews 66: 506-577).

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

[0211] Un equipo convencional puede incluir un reactor agitado lote-alimentado, un reactor agitado de lote, un reactor agitado de flujo continuo con ultrafiltración, y/o un reactor de columna de flujo de pistón continuo (Fernanda de Castilhos Corazza, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin and Ivo Neitzel, 2003, Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis, Acta Scientiarum. Technology 25: 33-38; Gusakov, A. V., and Sinityn, A. P., 1985, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, Enz. Microb. Technol. 7: 346-352), un reactor de desgaste (Ryu, S. K., and Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, Biotechnol. Bioeng. 25: 53-65), o un reactor con intensivo agitante inducido por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinityn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, Appl. Biochem. Biotechnol. 56: 141-153).

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

[0212] Pretratamiento. Al poner en práctica los métodos de la presente invención, cualquier proceso de pretratamiento conocido en la técnica puede utilizarse para interrumpir componentes de pared celular vegetal de material celulósico y/o que contiene xilano (Chandra et al., 2007, Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. 108: 67-93; Galbe and Zacchi, 2007, Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, Adv. Biochem. Engin. / Biotechnol. 108: 41-65; Hendriks and Zeeman, 2009, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, Bioresource Technol. 100: 10-18; Mosier et al., 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, Bioresource Technol. 96: 673-686; Taherzadeh and Karimi, 2008, Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, Int. J. of Mol. Sci. 9: 1621-1651; Yang and Wyman, 2008, Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol, Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofr. 2: 26-40).

[0213] Material celulósico o que contiene xilano puede también ser sometido a reducción de tamaño de partícula, pre-remojo, humidificación, lavado, o preparación antes de pretratamiento que usa métodos conocidos en la técnica.

[0214] Pretratamientos convencionales incluyen, pero de forma no limitativa, pretratamiento con vapor (con o sin explosión), pretratamiento de ácido diluido, pretratamiento de agua caliente, pretratamiento alcalino, pretratamiento

de cal, oxidación en húmedo, explosión en húmedo, explosión de fibra de amoníaco, pretratamiento organosolv, y pretratamiento biológico.

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

5 [0215] Material celulósico o que contiene xilano se puede pretratar antes de hidrólisis y/o fermentación. Pretratamiento es preferiblemente realizado antes de la hidrólisis. Alternativamente, el pretratamiento puede llevarse a cabo simultáneamente con hidrólisis enzimática para liberar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, y/o celobiosa.

10 En la mayoría de los casos la etapa de pretratamiento mismo produce alguna conversión de biomasa para azúcares fermentables (incluso en ausencia de enzimas).

[0216] Pretratamiento con vapor. En el pretratamiento con vapor, material celulósico o que contiene xilano se calienta para perturbar los componentes de pared celular vegetal, incluyendo lignina, hemicelulosa, y celulosa para hacer la celulosa y otras fracciones, por ejemplo, hemicelulosa, accesible para enzimas.

15 Material celulósico o que contiene xilano se pasa hacia o a través de un recipiente de reacción donde vapor se inyecta para aumentar la temperatura a la temperatura y la presión requeridas y se retiene en esto durante el tiempo de reacción deseado.

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

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

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

El pretratamiento con vapor es frecuentemente combinado con una descarga explosiva del material después del pretratamiento, que es conocido como explosión de vapor, esto es, explosiones rápidas intermitentes para presión atmosférica y régimen turbulento del material para aumentar el área de superficie accesible por fragmentación (Duff and Murray, 1996, *Bioresource Technology* 85: 1-33; Galbe and Zacchi, 2002, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 618-628; U.S. Patent Application No. 20020164730).

30 Durante pretratamiento con vapor, grupos de acetilo de hemicelulosa se dividen y el ácido resultante autocataliza hidrólisis parcial de la hemicelulosa para monosacáridos y oligosacáridos.

Lignina es quitada solo hasta un punto limitado.

35 [0217] Un catalizador tal como H₂SO₄ o SO₂ (típicamente de 0,3 a 3% p/p) es frecuentemente añadido antes del pretratamiento de vapor, que reduce el tiempo y temperatura, aumenta la recuperación, y mejora hidrólisis enzimática (Ballesteros *et al.*, 2006, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 496-508; Varga *et al.*, 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116: 509-523; Sassner *et al.*, 2006, *Enzyme Microb. Technol.* 39: 756-762).

40 [0218] Pretratamiento químico: el término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

45 Ejemplos de procesos de pretratamiento químico adecuado incluyen, por ejemplo, pretratamiento de ácido diluido, pretratamiento de cal, oxidación en húmedo, explosión por congelación de la fibra de amoníaco (AFEX), filtración de amoníaco (APR), y pretratamientos organosolv.

[0219] En el pretratamiento de ácido diluido, material celulósico o que contiene xilano se mezcla con ácido diluido, típicamente H₂SO₄, y agua para formar un lodo, calentado por vapor a la temperatura deseada, y después de un periodo de permanencia relampagueado a presión atmosférica.

50 El pretratamiento de ácido diluido se puede realizar con un número de diseños de reactor, por ejemplo, reactores de flujo de pistón, reactores de contracorriente, o reactores de lecho de encogimiento de contracorriente continua (Duff and Murray, 1996, *supra*; Schell *et al.*, 2004, *Bioresource Technol.* 91: 179-188; Lee *et al.*, 1999, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 93-115).

55 [0220] Diferentes métodos de pretratamiento bajo condiciones alcalinas también pueden usarse. Estos pretratamientos alcalinos incluyen, pero de forma no limitativa, pretratamiento de cal, oxidación en húmedo, filtración de amoníaco (APR), y explosión por congelación de la fibra de amoníaco (AFEX).

60 [0221] Pretratamiento de cal se realiza con carbonato cálcico, hidróxido sódico, o amoníaco a bajas temperaturas de 85-150°C y tiempos de estancia de 1 hora a más días (Wyman *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 1959-1966; Mosier *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 673-686).

WO 2006/110891, WO 2006/11899, WO 2006/11900, y WO 2006/110901 revelan métodos de pretratamiento que usa amoníaco.

65 [0222] Oxidación en húmedo es un pretratamiento térmico realizado típicamente a 180-200°C durante 5-15 minutos con adición de un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o sobrepresión de oxígeno (Schmidt and

Thomsen, 1998, *Bioresource Technol.* 64: 139-151; Palonen *et al.*, 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 1-17; Varga *et al.*, 2004, *Biotechnol. Bioeng.* 88: 567-574; Martin *et al.*, 2006, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1669-1677).

El pretratamiento se realiza a preferiblemente 1-40% de sustancia seca, más preferiblemente 2-30% de sustancia seca, y de la forma más preferible 5-20% de sustancia seca, y frecuentemente el pH inicial se aumenta por la adición de álcali tal como carbonato de sodio.

[0223] Una modificación del método de pretratamiento de oxidación en húmedo, conocida como explosión en húmedo (combinación de oxidación en húmedo y explosión de vapor), puede manejar sustancia seca hasta 30%.

En la explosión en húmedo, el agente oxidante se introduce durante pretratamiento después de un determinado tiempo de estancia.

El pretratamiento es luego terminado por flashing para presión atmosférica (WO 2006/032282).

[0224] Explosión de fibra de amoníaco (AFEX) implica tratar material celulósico o que contiene xilano con líquido o amoníaco gaseoso a temperaturas moderadas tales como 90-100°C y alta presión tal como 17-20 bar durante 5-10 minutos, donde el contenido de sustancia en seco puede ser tan alto como 60% (Gollapalli *et al.*, 2002, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 23-35; Chundawat *et al.*, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 96: 219-231; Alizadeh *et al.*, 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 1133-1141; Teymouri *et al.*, 2005, *Bioresource Technol.* 96: 2014-2018).

Pretratamiento AFEX produce la despolimerización de celulosa e hidrólisis parcial de hemicelulosa.

Complejos de lignina-carbohidrato son divididos.

[0225] Pretratamiento organosolv delignifica material celulósico o que contiene xilano por extracción usando etanol acuoso (40-60% etanol) a 160-200°C durante 30-60 minutos (Pan *et al.*, 2005, *Biotechnol. Bioeng.* 90: 473-481; Pan *et al.*, 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 94: 851-861; Kurabi *et al.*, 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 219-230).

Ácido sulfúrico es normalmente añadido como un catalizador.

En el pretratamiento organosolv, la mayoría de la hemicelulosa es quitada.

[0226] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados son descritos por Schell *et al.*, 2003, *Appl. Biochem. and Biotechnol.* Vol. 105-108, p. 69-85, and Mosier *et al.*, 2005, *Bioresource Technology* 96: 673-686, and U.S. Published Application 2002/0164730.

[0227] Pretratamiento químico es preferiblemente realizado como un tratamiento ácido, y más preferiblemente como un tratamiento de diluido continuo y/o ácido moderado.

El ácido es típicamente ácido sulfúrico, pero otros ácidos también pueden usarse, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno, o mezclas derivadas.

Tratamiento de ácido moderado se realiza en el margen de pH de preferiblemente 1-5, más preferiblemente 1-4, y de la forma más preferible 1-3.

En un aspecto, la concentración ácida está en el rango de preferiblemente 0,01 a 20 % en peso ácido, más preferiblemente 0,05 a 10 % en peso ácido, aún más preferiblemente 0,1 a 5 % en peso ácido, y de la forma más preferible 0,2 a 2,0 % en peso ácido.

El ácido se pone en contacto con material celulósico o que contiene xilano y se sujeta a una temperatura en el rango de preferiblemente 160-220°C, y más preferiblemente 165-195°C, durante periodos que varían de segundos a minutos a, por ejemplo, 1 segundo a 60 minutos.

[0228] En otro aspecto, el pretratamiento se realiza como un paso de explosión de fibra de amoníaco (paso de pretratamiento AFEX).

[0229] En otro aspecto, el pretratamiento tiene lugar en un lodo acuoso.

En aspectos preferidos, material celulósico o que contiene xilano está presente durante pretratamiento en cantidades preferiblemente entre 10-80 % en peso, más preferiblemente entre 20-70 % en peso, y de la forma más preferible entre 30-60 % en peso, tal como alrededor de 50 % en peso.

El material celulósico pretratado o que contiene xilano puede ser sin lavar o lavado utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, lavado con agua.

[0230] Pretratamiento mecánico: el término "pretratamiento mecánico" se refiere a varios tipos de trituración o fresado (por ejemplo, molienda en seco, molienda en húmedo, o fresado de bola vibratoria).

En un aspecto preferido, pretratamiento mecánico se realiza en un procesamiento por lote, sistema de hidrolizador de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, un Sunds Hydrolyzer disponible de Sunds Defibrator AB, Suecia.

[0231] Pretratamiento físico: el término "pretratamiento físico" se refiere a cualquier pretratamiento que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina de material celulósico o que contiene xilano.

Por ejemplo, pretratamiento físico puede implicar irradiación (por ejemplo, irradiación de microondas), explosión de vaporización, hidrotermólisis, y combinaciones de los mismos.

[0232] Pretratamiento físico puede implicar alta presión y/o alta temperatura (explosión de vapor).

En un aspecto, alta presión significa presión en el rango de preferiblemente aproximadamente 300 a aproximadamente 600 PSI, más preferiblemente aproximadamente 350 a aproximadamente 550 PSI, y de la forma más preferible aproximadamente 400 a aproximadamente 500 PSI, tal como alrededor de 450 PSI.

En otro aspecto, alta temperatura significa temperaturas en el rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 300°C, preferiblemente aproximadamente 140 a aproximadamente 235°C.

[0233] Pretratamiento físico combinado y químico: material celulósico o que contiene xilano se puede pretratar tanto físicamente como químicamente.

Por ejemplo, la etapa de pretratamiento puede implicar tratamiento de ácido diluido o moderado y alta temperatura y/o tratamiento de presión.

Los pretratamientos físicos y químicos puede llevarse a cabo consecutivamente o simultáneamente, como se desee. También puede ser incluido un pretratamiento mecánico.

[0234] Por consiguiente, en un aspecto preferido, material celulósico o que contiene xilano está sujeto a pretratamiento mecánico, químico o físico, o cualquier combinación de los mismos, para promover la separación y/o liberar celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

[0235] Pretratamiento biológico: el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina de material celulósico o que contiene xilano.

Técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar aplicación de microorganismos solubilizantes de lignina (ver, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh and Singh, 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; and Vallander and Eriksson, 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

[0236] Sacarificación. En la etapa de hidrólisis, también conocida como sacarificación, el material celulósico o que contiene xilano, por ejemplo, pretratado, se hidroliza para descomponer celulosa y hemicelulosa para azúcares fermentables, tales como glucosa, celobiosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, manosa, galactosa, y/o oligosacáridos solubles.

La hidrólisis se realiza enzimáticamente por una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención.

Los componentes de la composición de enzimas también pueden ser añadidos consecutivamente.

[0237] Hidrólisis enzimática es preferiblemente realizada en un ambiente acuoso adecuado bajo condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. En un aspecto preferido, la hidrólisis es realizada bajo condiciones adecuadas para la actividad de la enzima(s), es decir, óptimas para la enzima(s).

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

[0238] La sacarificación es generalmente realizada en los reactores de tanque agitado o fermentadores bajo pH controlado, temperatura, y condiciones de mezcla.

Tiempo de proceso, temperatura y condiciones de pH adecuados pueden prontamente ser determinados por un experto en la técnica. Por ejemplo, la sacarificación puede durar hasta 200 horas, pero es típicamente realizada durante preferiblemente aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, más preferiblemente aproximadamente 16 a aproximadamente 72 horas, y de la forma más preferible aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas.

La temperatura está en el rango de preferiblemente aproximadamente 25°C a aproximadamente 70°C, más preferiblemente aproximadamente 30°C a aproximadamente 65°C, y más preferiblemente aproximadamente 40°C a 60°C, en particular aproximadamente 50°C.

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

El contenido en sustancias secas está en el rango de preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 50 % en peso, más preferiblemente aproximadamente 10 a aproximadamente 40 % en peso, y de la forma más preferible aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % en peso.

[0239] Las cantidades óptimas de las enzimas y polipéptidos con actividad de xilanasas dependen de diferentes factores incluyendo, pero no limitado a, la mezcla de enzimas de componente, el material celulósico o que contiene xilano, la concentración del material celulósico o que contiene xilano, el pretratamiento(s) del material celulósico o

que contiene xilano, temperatura, tiempo, pH, e inclusión de organismo fermentador (por ejemplo, levadura para sacarificación simultánea y fermentación).

5 [0240] En un aspecto, una cantidad eficaz de enzima(s) celulolítica y/o enzima(s) que degradan xilano para material celulósico o que contienen xilano es aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de alrededor de 0,5 a aproximadamente 40 mg, más preferiblemente de alrededor de 0,5 a aproximadamente 25 mg, más preferiblemente de alrededor de 0,75 a aproximadamente 20 mg, más preferiblemente de alrededor de 0,75 a aproximadamente 15 mg, aún más preferiblemente de alrededor de 0,5 a aproximadamente 10 mg, y de la forma más preferible de alrededor de 2,5 a aproximadamente 10 mg por g de material celulósico o que contiene xilano.

10 [0241] En otro aspecto, una cantidad eficaz de polipéptido(s) con actividad de xilanasas para material celulósico o que contiene xilano es de aproximadamente 0,01 a de aproximadamente 50,0 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg, más preferiblemente de alrededor de 0,025 a aproximadamente 1,5 mg, más preferiblemente de alrededor de 0,05 a aproximadamente 1,25 mg, más preferiblemente de alrededor de 0,075 a aproximadamente 1,25 mg, más preferiblemente de alrededor de 0,1 a aproximadamente 1,25 mg, aún más preferiblemente de alrededor de 0,15 a aproximadamente 1,25 mg, y de la forma más preferible de alrededor de 0,25 a aproximadamente 1,0 mg por g de material celulósico o que contiene xilano.

20 [0242] En otro aspecto, una cantidad eficaz de polipéptido(s) con actividad de xilanasas para enzima(s) celulolítica y/o enzima(s) que degrada xilano es de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 g, preferiblemente de alrededor de 0,01 a aproximadamente 1,0 g, más preferiblemente de alrededor de 0,15 a aproximadamente 0,75 g, más preferiblemente de alrededor de 0,15 a aproximadamente 0,5 g, más preferiblemente de alrededor de 0,1 a aproximadamente 0,5 g, aún más preferiblemente de alrededor de 0,1 a aproximadamente 0,5 g, y de la forma más preferible de alrededor de 0,05 a aproximadamente 0,2 g por g de enzima(s) celulolítica.

30 [0243] En un aspecto, la composición enzimática comprende o comprende además una o más (varias) proteínas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, un polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.
En otro aspecto, la celulasa es preferiblemente una o más (varios) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

35 En otro aspecto, la hemicelulasa es preferiblemente una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una esterasa de acetilmanano, una esterasa de acetixileno, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronoil, una mananasa, una manosidasa, una xilanasas, y una xilosidasa.

40 [0244] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas celulolíticas.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende o comprende además una o más (varias) enzimas hemicelulolíticas.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (varios) enzimas celulolíticas y una o más (varios) enzimas hemicelulolíticas.

45 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (varios) enzimas seleccionadas del grupo de enzimas celulolíticas y enzimas hemicelulolíticas.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una beta-glucosidasa.

50 En otro aspecto, la composición enzimática comprende un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

55 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una beta-glucosidasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa y una celobiohidrolasa.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa y una beta-glucosidasa.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa y una beta-glucosidasa.

60 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.
En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

65 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

- [0245] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de acetilmanano.
 5 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de acetixileno.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una arabinanasa (por ejemplo, alfa-L-arabinanasa).
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una arabinofuranosidasa (por ejemplo, alfa-L-arabinofuranosidasa).
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de ácido cumárico.
 10 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una feruloil esterasa.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una galactosidasa (por ejemplo, alfa-galactosidasa y/o beta-galactosidasa).
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una glucuronidasa (por ejemplo, alfa-D-glucuronidasa).
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de glucuronoil.
 15 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una mananasa.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una manosidasa (por ejemplo, beta manosidasa).
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una xilanasa.
 En un aspecto preferido, la xilanasa es una xilanasa de familia 10.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una xilosidasa (por ejemplo, beta-xilosidasa).
 20 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una expansina.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una lacasa.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una enzima ligninolítica.
 En un aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una manganeso peroxidasa.
 25 En otro aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una lignina peroxidasa.
 En otro aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una enzima que produce H₂O₂.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una pectinasa.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una peroxidasa.
 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una proteasa.
 30 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una swollenina.

[0246] En los métodos de la presente invención, la enzima(s) se puede adicionar antes o durante la fermentación, por ejemplo, durante sacarificación o durante o después de la propagación del microorganismo(s) de fermentación.

- 35 [0247] Uno o más (varios) componentes de la composición enzimática pueden ser proteínas tipo salvaje, proteínas recombinantes, o una combinación de proteínas de tipo salvaje y proteínas recombinantes.
 Por ejemplo, uno o más (varios) componentes pueden ser proteínas nativas de una célula, que se usan como una célula huésped para expresar de forma recombinante otros uno o más (varios) componentes de la composición enzimática.
 40 Uno o más (varios) componentes de la composición enzimática se pueden producir como monocomponentes, que son luego combinados para formar la composición enzimática.
 La composición enzimática puede ser una combinación de preparaciones de proteína de varios componentes y monocomponentes.
 45 [0248] Las enzimas usadas en los métodos de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para uso, tal como, por ejemplo, un caldo de fermentación crudo con o sin células quitadas, un lisado celular con o sin detrito celular, una preparación semi-purificada o purificada enzimática, o una célula huésped como una fuente de las enzimas.
 La composición enzimática puede ser un polvo seco o granulado, un granulado no en polvo, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida estabilizada.
 50 Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico según procesos establecidos.

- [0249] Las enzimas se pueden derivar u obtener de cualquier origen adecuado, incluyendo origen bacteriano, fúngico, levadura, planta, o mamífero.
 55 El término "obtenido" significa aquí que la enzima se pueden aislar de un organismo que produce naturalmente la enzima como una enzima nativa.
 El término "obtenido" también significa aquí que la enzima se pueden producir de forma recombinante en un organismo huésped usando métodos descritos aquí, donde la enzima de forma recombinante producida es bien
 60 nativa o extranjera al organismo huésped o tiene una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, con uno o más (varios) aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima de forma recombinante producida que es mutante y/o fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácido nucleico conocidos en la técnica. Contenido en el significado de una enzima nativa están las variantes naturales y en el significado de una enzima extranjera están las variantes
 65 obtenidas de forma recombinante, tal como por mutagénesis dirigida al sitio o redistribución.

[0250] El polipéptido con actividad enzimática puede ser un polipéptido bacteriano.

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

[0251] En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis* con actividad enzimática.

[0252] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi subesp. Zooepidemicus* con actividad enzimática.

[0253] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans* con actividad enzimática.

[0254] El polipéptido con actividad enzimática también puede ser un polipéptido fúngico, y más preferiblemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia* con actividad enzimática; o más preferiblemente un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromices*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizofilum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria* con actividad enzimática.

[0255] En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis* con actividad enzimática.

[0256] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *microspora de Thielavia*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, o *Trichophaea saccata* con actividad enzimática.

[0257] Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína de los polipéptidos con actividad enzimática también pueden ser usados.

[0258] Uno o más (varios) componentes de la composición enzimática puede ser un componente recombinante, es decir, producido por clonación de una secuencia de ADN que codifica del componente único y célula posterior transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (ver, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244).

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

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

[0259] En un aspecto, la una o más (varios) enzimas celulolíticas comprenden una preparación enzimática celulolítica comercial.

Ejemplos de preparaciones enzimáticas celulolíticas comerciales adecuados para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLIC™ CTec (Novozymes A/S), CELLIC™ CTec2 (Novozymes A/S), CELLUCLAST™ (Novozymes A/S), NOVOZYME™ 188 (Novozymes A/S), CELLUZYME™ (Novozymes A/S), CEREFLO™ (Novozymes A/S), and ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), ACCELERASE™ (Genencor Int.), LAMINEX™ (Genencor

Int.), SPEZYME™ CP (Genencor Int.), ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH), FIBREZYME® LDI (Dyadic International, Inc.), FIBREZYME® LBR (Dyadic International, Inc.), o VISCOSTAR® 150L (Dyadic International, Inc.). Las enzimas de celulasa se agregan en catidades efectivas de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5,0 % en peso de sólidos, más preferiblemente de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 4,0 % en peso de sólidos, y de la forma más preferible de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 2,0 % en peso de sólidos.

[0260] Ejemplos de endoglucanasas bacterianas que se pueden usar en estos métodos incluyen, pero de forma no limitativa, una endoglucanasa de *Acidothermu cellulolyticus* (WO 91/05039; WO 93/15186; patente US nº 5,275,944; WO 96/02551; patente US nº 5,536,655, WO 00/70031, WO 05/093050); endoglucanasa III de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050); y endoglucanasa V de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050).

[0261] Ejemplos de endoglucanasas fúngicas que se pueden usar incluir, pero de forma no limitativa, una endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (Penttila et al., 1986, gen 45: 253-263; *Trichoderma reesei* Cel7B endoglucanasa I; GENBANK™ registro nº M15665); endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* (Saloheimo, et al., 1988, gen 63:11-22; *Trichoderma reesei* Cel5A endoglucanasa II; GENBANK™ registro nº M19373) endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* (Okada et al., 1988, Appl. Environ. Microbiol. 64: 555-563; GENBANK™ registro nº AB003694); *Trichoderma reesei* endoglucanasa V (Saloheimo et al., 1994, Molecular Microbiology 13: 219-228; GENBANK™ registro nº Z33381); *Aspergillus aculeatus* endoglucanasa (Ooi et al., 1990, Nucleic Acids Research 18: 5884); *Aspergillus kawachii* endoglucanasa (Sakamoto et al., 1995, Current Genetics 27: 435-439); *Erwinia carotovora* endoglucanasa (Saarilahti et al., 1990, Gene 90: 9-14); *Fusarium oxysporum* endoglucanasa (GENBANK™ registro nº L29381); *Humicola grisea var. thermoidea* endoglucanasa (GENBANK™ registro nº AB003107); *Melanocarpus albomyces* endoglucanasa (GENBANK™ registro nº MAL515703); *Neurospora crassa* endoglucanasa (GENBANK™ registro nº XM 324477); *Humicola insolens* endoglucanasa V); *Myceliophthora thermophila* CBS 117,65 endoglucanasa; basidiomycete CBS 495,95 endoglucanasa; basidiomycete CBS 494,95 endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6B endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6C endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7C endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7E endoglucanasa; *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7F endoglucanasa; *Cladorrhinum foecundissimum* ATCC 62373 CEL7A endoglucanasa; and *Trichoderma reesei* cepa nº VTT-D-80133 endoglucanasa (GENBANK™ registro nº M15665).

[0262] Ejemplos de celobiohidrolasas útiles en combinación con la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*; celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*; celobiohidrolasa de *Humicola insolens* I); celobiohidrolasa II de *Myceliophthora thermophila*; celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A); celobiohidrolasa I *thermophilum* de *Chaetomium*; y celobiohidrolasa II *thermophilum* de *Chaetomium*, celobiohidrolasa I de *Aspergillus fumigatus*, y celobiohidrolasa II de *Aspergillus fumigatus*.

[0263] Ejemplos de beta-glucosidasas útiles incluyen, pero de forma no limitativa, beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*; beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*; *Penicillium brasilianum* IBT 20888 beta-glucosidasa; beta-glucosidasa de *Aspergillus niger*; y beta-glucosidasa de *Aspergillus aculeatus*.

La beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* puede ser obtenida según WO 2002/095014.

La beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* puede ser obtenida según WO 2005/047499.

La beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* puede ser obtenida según WO 2007/019442.

La beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* puede ser obtenida según Dan et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 4973-4980.

La beta-glucosidasa de *Aspergillus aculeatus* puede ser obtenida según Kawaguchi et al., 1996, gen 173: 287-288.

[0264] La beta-glucosidasa puede ser una proteína de fusión.

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

[0265] Otras endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas útiles se describen en las familias de hidrolasa de glicosil numeroso que utilizan la clasificación según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat B., and Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0266] Otras enzimas celulolíticas que pueden ser útiles son descritas en EP 495,257, EP 531,315, EP 531,372, WO 89/09259, WO 94/07998, WO 95/24471, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 96/034108, WO 97/14804, WO 98/08940, WO 98/012307, WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 98/028411, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025846, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2000/009707, WO 2002/050245, WO 2002/0076792, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, patente EEUU nº 4,435,307, patente US nº 5,457,046, patente US nº 5,648,263, patente US nº 5,686,593, patente US nº 5,691,178, patente US nº 5,763,254, y patente US nº 5,776,757.

[0267] En los métodos anteriormente descritos, cualquier polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica se puede usar.

[0268] En un primer aspecto, el polipéptido con actividad de mejora celulolítica comprende los motivos siguientes:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV],

donde X es cualquier aminoácido, X(4,5) es cualquier aminoácido en 4 o 5 posiciones contiguas, y X(4) es cualquier aminoácido en 4 posiciones contiguas.

[0269] El polipéptido que comprenden los motivos mencionados anteriormente puede comprender además:

H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV],

[EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV], or

H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] y [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV],

donde X es cualquier aminoácido, X(1,2) es cualquier aminoácido en 1 posición o 2 posiciones contiguas, X(3) es cualquier aminoácido en 3 posiciones contiguas, y X(2) es cualquier aminoácido en 2 posiciones contiguas.

En los motivos anteriores, la aceptada abreviatura de aminoácido de una sola letra IUPAC es empleada.

[0270] En otro aspecto, el polipéptido con actividad de mejora celulolítica comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[iW]-[AILMV].

En otro aspecto, el polipéptido aislado que tiene actividad de mejora celulolítica comprende además [EQ]-X-i-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].

En otro aspecto, el polipéptido con actividad de mejora celulolítica comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[iW]-[AILMV] y [EQ]-X-i-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].

[0271] En un segundo aspecto, el polipéptido con actividad de mejora celulolítica comprende el motivo siguiente:

[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ],

donde x es cualquier aminoácido, x(4,5) es cualquier aminoácido en 4 o 5 posiciones contiguas, y x(3) es cualquier aminoácido en 3 posiciones contiguas.

En el motivo anterior, la abreviatura aceptada de aminoácido de una sola letra IUPAC es empleada.

[0272] Ejemplos de polipéptidos útiles que tienen actividad de mejora celulolítica incluyen, pero de forma no limitativa, polipéptidos que tiene actividad de mejora celulolítica de *Thielavia terrestris* (WO 2005/074647); polipéptidos que tiene actividad de mejora celulolítica de *Thermoascus aurantiacus* (WO 2005/074656); polipéptidos que tiene actividad de mejora celulolítica de *Trichoderma reesei* (WO 2007/089290); y polipéptidos que tiene actividad de mejora celulolítica de *Myceliophthora thermophila* (WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, y WO 2009/085868).

WO 2008/151043 divulga métodos para aumentar la actividad de un polipéptido con actividad de mejora celulolítica añadiendo un catión metálico bivalente de activación soluble a una composición que comprende el polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

[0273] En un aspecto, la una o más (varias) enzimas hemicelulolíticas comprenden una preparación enzimática hemicelulolítica comercial.

Ejemplos de preparaciones enzimáticas hemicelulolíticas comerciales adecuadas para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, SHEARZYME™ (Novozymes A/S), CELLIC™ HTec (Novozymes A/S), CELLIC™ HTec2 (Novozymes A/S), VISCOZYME® (Novozymes A/S), ULTRAFLO® (Novozymes A/S), PULPZYME® HC (Novozymes A/S), xilanasa de MULTIFECT® (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 xilanasa (DSM), DEPOL™ 333P (Biocatalysts Limit, Wales, UK), DEPOL™ 740L (Biocatalysts Limit, Wales, UK), y DEPOL™ 762P (Biocatalysts Limit, Wales, UK).

[0274] Ejemplos de xilanasas útiles incluyen, pero de forma no limitativa, xilanasa de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP:AAR63790 WO 94/21785), xilanasas de *Aspergillus fumigatus* (WO 2006/078256), y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 xilanasas (WO 2009/079210).

[0275] Ejemplos de beta-xilosidasas útiles incluyen, pero de forma no limitativa, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* (UniProtKB/TrEMBL número de registro Q92458), *Talaromyces emersonii* (SwissProt número de registro Q8X212), y *Neurospora crassa* (SwissProt número de registro Q7SOW4).

[0276] Ejemplos de acetilxilano esterasesas útiles incluyen, pero de forma no limitativa, acetilxilano esterasa de *Hipocrea jecorina* (WO 2005/001036), acetilxilano esterasa de *Neurospora crassa* (UniProt número de registro q7s259), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 acetilxilano esterasa (WO 2009/042846), acetilxilano esterasa de *Chaetomium globosum* (Uniprot número de registro Q2GWX4), acetilxilano esterasa de *Chaetomium gracile* (GeneSeqP número de registro AAB82124), *Phaeosphaeria nodorum* acetilxilano esterasa (Uniprot número de registro Q0UHJ1) y *Humicola insolens* DSM 1800 acetilxilano esterasa (WO 2009/073709).

[0277] Ejemplos de esterasesas de ácido ferúlico útiles incluyen, pero de forma no limitativa, *Humicola insolens* DSM 1800 feruloil esterasa (WO 2009/076122), feruloil esterasa de *Neurospora crassa* (UniProt número de registro Q9HGR3), y *Neosartorya fischeri* feruloil esterasa (UniProt número de registro A1 D9T4).

[0278] Ejemplos de arabinofuranosidasas útiles incluyen, pero de forma no limitativa, *Humicola insolens* DSM 1800 arabinofuranosidasa (WO 2009/073383) y arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger* (GeneSeqP número de registro AAR94170).

5 [0279] Ejemplos de alfa-glucuronidasas útiles incluyen, pero de forma no limitativa, alfa-glucuronidasa *Aspergillus clavatus* (UniProt número de registro alcc12), alfa-glucuronidasa de *Trichoderma reesei* (UniProt número de registro Q99024), alfa-glucuronidasa de *Talaromyces emersonii* (UniProt número de registro Q8X211), alfa-glucuronidasa de *Aspergillus niger* (UniProt número de registro Q96WX9), *Aspergillus terreus* alfa-glucuronidasa (SwissProt número de registro Q0CJP9), y alfa-glucuronidasa de *Aspergillus fumigatus* (SwissProt número de registro Q4WW45).

10 [0280] Las enzimas y proteínas se pueden producir por fermentación de las cepas microbianas mencionadas anteriormente en un medio nutritivo que contiene fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas adecuadas, que usa procedimientos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Bennett, J.W. Y LaSure, L.. (eds.), More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, CA, 1991)

15 Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para crecimiento y producción enzimática se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Bailey, J.E., and Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

20 [0281] La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula dando como resultado la expresión o aislamiento de una enzima.

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

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

30 [0282] Fermentación. Los azúcares fermentables obtenidos del material celulósico hidrolizado se pueden fermentar por uno o más (varios) microorganismos fermentadores capaces de fermentación de los azúcares directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado. "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprenda un paso de fermentación.

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

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

40 [0283] En la etapa de fermentación, azúcares, liberados del material celulósico como resultado del pretratamiento y pasos de hidrólisis enzimática, se fermentan hasta un producto, por ejemplo, etanol, por un organismo fermentador, tal como levadura.

Hidrólisis (sacarificación) y fermentación pueden ser separadas o simultáneas, como se describe en este caso.

45 [0284] Cualquier material celulósico hidrolizado adecuado se puede usar en la etapa de fermentación.

El material es generalmente seleccionado basado en el producto de fermentación deseado, es decir, la sustancia a ser obtenida de la fermentación, y el proceso empleado, como es bien conocido en la técnica.

50 [0285] El término "medio de fermentación" se entiende aquí para referirse a un medio antes de que el microorganismo(s) de fermentación sea añadido, tal como un medio resultante de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en una sacarificación simultánea y proceso de fermentación (SSF).

55 [0286] "Microorganismos de fermentación" se refiere a cualquier microorganismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación deseado para producir un producto de fermentación.

El organismo fermentador puede ser C₆ y/o C₅ organismos fermentadores, o combinación de los mismos.

Ambos C₆ y C₅ organismos fermentadores se conocen en la técnica. Microorganismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, maltosa, manosa, galactosa, u oligosacáridos, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

60 [0287] Ejemplos de organismos fermentadores bacterianos y fúngicos que producen etanol son descritos por Lin *et al.*, 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

65 [0288] Ejemplos de microorganismos fermentadores que pueden fermentar C₆ azúcares incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tales como levadura.

Levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

[0289] Ejemplos de organismos fermentadores que pueden fermentar C₅ azúcares incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tales como alguna levadura.

5 C₅ levadura fermentadora preferida incluye cepas de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis*, tales como *Pichia stipitis* CBS 5773; cepas de *Candida*, preferiblemente *Candida boidinii*, *Candida brassicae*, *Candida sheatae*, *Candida diddensii*, *Candida pseudotropicalis*, o *Candida utilis*.

10 [0290] Otros organismos fermentadores incluyen cepas de *Zymomonas*, tales como *Zymomonas mobilis*; *Hansenula*, tal como *Hansenula anomala*; *Kluyveromyces*, tal como *K. fragilis*; *Schizosaccharomyces*, tal como *S. pombe*; *E. coli*, especialmente cepas de *E. coli* que se han modificado genéticamente para mejorar el rendimiento de etanol; *Clostridium*, tales como *Clostridium acetobutylicum*, *Chlostridium thermocellum*, y *Chlostridium phytofermentans*; *Geobacillus* sp.; *Thermoanaerobacter*, tales como *Thermoanaerobacter saccharoliticum*; y *Bacillus*, tales como *Bacillus coagulans*.

15 [0291] En un aspecto, la levadura es un *Saccharomyce* spp.
En otro aspecto, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
En todavía otro aspecto, la levadura es *Saccharomyces distaticus*.
En otro aspecto, la levadura es *Saccharomyces uvarum*.
En otro aspecto preferido, la levadura es un *Kluyveromyces*.
20 En otro aspecto, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*.
En otro aspecto, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*.
En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*.
En otro aspecto, la levadura es *Candida boidinii*.
En otro aspecto, la levadura es *Candida brassicae*.
25 En otro aspecto, la levadura es *Candida diddensii*.
En otro aspecto, la levadura es *Candida pseudotropicalis*.
En otro aspecto, la levadura es *Candida utilis*.

30 [0292] En otro aspecto, la levadura es una *Clavispora*.
En otro aspecto, la levadura es *Clavispora lusitaniae*.
En otro aspecto, la levadura es *Clavispora opuntiae*.
En otro aspecto, la levadura es un *Pachysolen*.
En otro aspecto, la levadura es *Pachysolen tannophilus*.
En otro aspecto, la levadura es un *Pichia*.
35 En otro aspecto, la levadura es un *Pichia stipitis*.
En otro aspecto, la levadura es un *Bretannomyces*.
En otro aspecto, la levadura es *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

40 [0293] Bacterias que pueden fermentar eficazmente hexosa y pentosa en etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium thermocellum*, *Chlostridium phytofermentans*, *Geobacillus* sp., *Thermoanaerobacter saccharoliticum*, y *Bacillus coagulans* (Philippidis, 1996, *supra*).

45 [0294] En un aspecto, la bacteria es una *Zymomonas*.
En otro aspecto, la bacteria es *Zymomonas mobilis*.
En otro aspecto, la bacteria es una *Clostridium*.
En otro aspecto, la bacteria es *Clostridium thermocellum*.

50 [0295] Levadura disponible comercialmente adecuada para producción de etanol incluye, por ejemplo, levadura ETHANOL RED™ (Fermentis/Lesaffre, USA), FALI™ (Fleischmann's Yeast, USA), SUPERSTART™ y levadura fresca de THERMOSACC™ (Ethanol Technology, WI, USA), BIOFERM™ AFT y XR (NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, USA), GERT STRAND™ (Gert Strand AB, Sweden), y FERMIOL™ (DSM Specialties).

55 [0296] En un aspecto, el microorganismo fermentador ha sido genéticamente modificado para proporcionar la capacidad para fermentar azúcares de pentosa, tales como xilosa, arabinosa, usando microorganismos y xilosa y arabinosa, co-usando microorganismos.

60 [0297] La clonación de genes heterólogos en varios microorganismos fermentadores ha llevado a la construcción de organismos capaces de convertir hexosas y pentosas para (cofermentación) en etanol (Chen and Ho, 1993, Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Biochem. Biotechnol. 39-40: 135-147; Ho *et al.*, 1998, Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose, Appl. Environ. Microbiol. 64: 1852-1859; Kotter and Ciriacy, 1993, Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 776-783; Walfridsson *et al.*, 1995, Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase, Appl. Environ. Microbiol. 61: 4184-4190;

- 5 Kuyper *et al.*, 2004, Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle, FEMS Yeast Research 4: 655-664; Beall *et al.*, 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*, Biotech. Bioeng. 38: 296-303; Ingram *et al.*, 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng. 58: 204-214; Zhang *et al.*, 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, Science 267: 240-243; Deanda *et al.*, 1996, Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4465-4470; WO 2003/062430, xylose isomerase).
- 10 [0298] En un aspecto, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Saccharomyces cerevisiae*.
En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Zymomonas mobilis*.
En otro aspecto, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Escherichia coli*.
En otro aspecto, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Klebsiella oxytoca*.
En otro aspecto, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Kluyveromyces sp.*
- 15 [0299] Es bien conocido en la técnica que los organismos anteriormente descritos también pueden usarse para producir otras sustancias, como se describe en este caso.
- 20 [0300] El microorganismo fermentador es típicamente añadido a la lignocelulosa degradada o hidrolizada y la fermentación se realiza durante aproximadamente 8 a aproximadamente 96 horas, tal como de aproximadamente 24 a aproximadamente 60 horas.
La temperatura es típicamente de entre aproximadamente 26°C a aproximadamente 60°C, en particular aproximadamente 32°C o 50°C, y de alrededor de pH 3 a cerca de pH 8, tal como alrededor de pH 4-5, 6, o 7.
- 25 [0301] En un aspecto, la levadura y/o otro microorganismo se aplican al material celulósico degradado y la fermentación se realiza durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, tal como típicamente 24-60 horas.
En otro aspecto, la temperatura es preferiblemente de entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 50°C, y de la forma más preferible de aproximadamente 32°C a aproximadamente 50°C, en particular aproximadamente 32°C o 50°C, y el pH es generalmente de acerca de pH 3 a cerca de pH 7, preferiblemente alrededor de pH 4-7.
Sin embargo, algunos organismos fermentadores, por ejemplo, bacterias, tienen temperatura óptima de fermentación más alta.
Levadura u otro microorganismo es preferiblemente aplicado en cantidades de aproximadamente 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de aproximadamente 10^7 a 10^{10} , especialmente de aproximadamente 2×10^8 concentración de células viables por ml de caldo de fermentación.
35 Más información respecto a la utilización de levadura para fermentación se puede encontrar en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999)
- 40 [0302] Para producir etanol, después de la fermentación, el compuesto fermentado se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido según los métodos de la invención se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutrales potables, o etanol industrial.
- 45 [0303] Un estimulador de fermentación se puede usar en combinación con cualquiera de los procesos descritos aquí para mejorar adicionalmente el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como mejora de la velocidad y rendimiento de etanol.
Un "estimulador de fermentación" se refiere a estimuladores para crecimiento de los microorganismos fermentadores, en particular, levadura.
Estimuladores de fermentación preferidos para crecimiento incluyen vitaminas y minerales.
50 Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzóico, ácido fólico, riboflavina, y vitaminas A, B, C, D, y E. Ver, por ejemplo, Alfenore *et al.*, Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002).
Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, y Cu.
55
- [0304] Productos de fermentación: un producto de fermentación puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación.
El producto de fermentación puede ser, sin limitación, un alcohol (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol, y xilitol); un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico, y ácido xilónico); una cetona (por ejemplo, acetona); un aminoácido (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); y un gas (por ejemplo, metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂), y monóxido de carbono (CO)).
65 El producto de fermentación puede también ser proteína como un producto de valor alto.

- [0305] En un aspecto, el producto de fermentación es un alcohol.
Se entiende que el término "alcohol" abarca una sustancia que contiene una o varias fracciones hidroxilo.
En otro aspecto, el alcohol es arabitol.
5 En otro aspecto, el alcohol es butanol.
En otro aspecto, el alcohol es etanol.
En otro aspecto, el alcohol es glicerol.
En otro aspecto, el alcohol es metanol.
En otro aspecto, el alcohol es 1,3-propanodiol.
10 En otro aspecto, el alcohol es sorbitol.
En otro aspecto, el alcohol es xilitol.
Ver, por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Silveira, M. M., and Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., and Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.
- 20 [0306] En otro aspecto, el producto de fermentación es un ácido orgánico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido acético.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido acetónico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido adípico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido ascórbico.
25 En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido cítrico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido 2,5-diceto-D-glucónico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido fórmico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido fumárico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido glucárico.
30 En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido glucónico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido glucurónico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido glutárico.
En otro aspecto preferido, el ácido orgánico es ácido 3-hidroxipropiónico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido itacónico.
35 En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido láctico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido málico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido malónico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido oxálico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido propiónico.
40 En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido succínico.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido xilónico.
Ver, por ejemplo, Chen, R., and Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448.
- 45 [0307] En otro aspecto, el producto de fermentación es una cetona.
Se entiende que el término "cetona" abarca una sustancia que contiene una o varias fracciones de cetona.
En otro aspecto, la cetona es acetona.
Ver, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, *supra*.
- 50 [0308] En otro aspecto, el producto de fermentación es un aminoácido.
En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido aspártico.
En otro aspecto, el aminoácido es ácido glutámico.
En otro aspecto, el aminoácido es glicina.
En otro aspecto, el aminoácido es lisina.
55 En otro aspecto, el aminoácido es serina.
En otro aspecto, el aminoácido es treonina.
Ver, por ejemplo, Richard, A., and Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 501-515.
- 60 [0309] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un gas.
En otro aspecto, el gas es metano.
En otro aspecto, el gas es H₂.
En otro aspecto, el gas es CO₂.
En otro aspecto, el gas es CO.
- 65 Ver, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya, and K. Kiriyaama, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Science and Technology* 36 (6-7): 41-47; and Gunaseelan

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

[0310] Recuperación. El producto(s) de fermentación puede ser opcionalmente recuperado del medio de fermentación que utiliza cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación, o extracción.

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

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

Otros usos

[0311] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar con actividad limitada de otra enzimas xilanólicas para degradar xilanos para la producción de oligosacáridos.

Los oligosacáridos se pueden utilizar como agentes de carga, como oligosacáridos de arabinoxilano liberados de material de pared celular de cereal, o arabinoxilanas más o menos purificadas de cereales.

[0312] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar en combinación con otras enzimas xilanólicas para degradar xilanos para xilosa y otros monosacáridos (patente US nº 5,658,765).

La xilosa liberada se puede convertir en otros compuestos.

[0313] Los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar junto con otras enzimas como glucanasas para mejorar la extracción de aceite de material vegetal rico de aceite, como aceite de maíz de embriones de maíz.

[0314] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar en cocción para mejorar el desarrollo, elasticidad, y/o estabilidad de masa y/o el volumen, estructura de miga, y/o propiedades de antiendurecimiento del producto horneado (ver patente US nº 5,693,518).

Los polipéptidos también se pueden usar para la preparación de masa o productos horneados obtenidos a partir de cualquier tipo de harina o comida (por ejemplo, basado en trigo, centeno, cebada, avena, o maíz).

Los productos horneados producidos con un polipéptido de la presente invención incluyen pan, bollos, baguettes y similares.

Para uso de cocción, un polipéptido de la presente invención se puede utilizar como única o principal actividad enzimática, o se puede utilizar en combinación con otras enzimas tales como una xilanasas, una lipasa, una amilasa, una oxidasa (por ejemplo, glucosa-oxidasa, peroxidasa), una lacasa y/o una proteasa.

[0315] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar para modificación de pienso para animales y pueden ejercer su efecto bien *in vitro* (por componentes de modificación de la alimentación) o *in vivo* para mejorar digestibilidad de alimentación y aumentar la eficiencia de su utilización (patente US nº 6,245,546).

Los polipéptidos se pueden añadir a composiciones de pienso para animales que contienen altas cantidades de arabinoxilanas y glucuronoxilanos, por ejemplo, alimentación con cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, o maíz.

Cuando añadido a la comida, el polipéptido mejorará la descomposición *in vivo* de material de pared celular vegetal parcialmente debido a una reducción de viscosidad intestinal (Bedford *et al.*, 1993, Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition, pp. 73-77), por la cual utilización mejorada de los nutrientes de planta por el animal es conseguida.

Así, el índice de crecimiento y/o relación de conversión de alimentación (es decir, el peso de alimentación ingerida con respecto a aumento de peso) del animal es mejorado.

[0316] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar en la industria de papel y pulpa, entre otras cosas, en los procesos de blanqueo para mejorar la luminosidad de pastas de papel blanqueadas por lo cual la cantidad de cloro usado en las etapas de blanqueo es reducida, y para aumentar el refinado de las pastas de papel en el proceso de reciclaje de papel (Eriksson, 1990, Wood Science and Technology 24: 79-101; Paice *et al.*, 1988, Biotechnol. and Bioeng. 32: 235-239, and Pommier *et al.*, 1989, Tappi Journal 187-191).

El tratamiento de pasta lignocelulósica puede ser realizado, por ejemplo, como se describe en la patente US nº 5,658,765, WO 93/08275, WO 91/02839, y WO 92/03608.

[0317] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar en elaboración de cerveza, en particular para mejorar la filtrabilidad de jugo que contiene, por ejemplo, cebada y/o malta de sorgo (WO 2002/24926).

Los polipéptidos se pueden utilizar de la misma manera que pentosanasas de forma convencional usadas para elaboración de cerveza, por ejemplo, como se describe por Viëtor *et al.*, 1993, J. Inst. Brew. 99: 243-248; and EP 227159.

Además, los polipéptidos se pueden utilizar para el tratamiento de bagazo, es decir, residuos de producción de mosto de cerveza que contienen cebada o cebada malteada u otros cereales, para mejorar la utilización de los residuos para, por ejemplo, pienso para animales.

[0318] Los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar para la separación de componentes de materiales de célula vegetal, en particular de componentes de cereal tales como componentes de trigo.

De interés particular es la separación de trigo en gluten y almidón, es decir, componentes de interés comercial considerable.

El proceso de separación se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica, tal como el denominado proceso de batido (o proceso de molienda en húmedo) realizada como un hidroclón o un proceso de decantador.

5 En el proceso de batido, la materia prima es una dispersión bombeable de diluido del material vegetal tal como trigo a ser sometido a separación.

En un proceso de separación de trigo, la dispersión está hecha normalmente de harina de trigo y agua.

10 [0319] Los polipéptidos de la invención también se pueden usar en la preparación de fruta o jugo vegetal para aumentar rendimiento (ver, por ejemplo, patente US nº 6,228,630).

[0320] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar como un componente de un sistema de descrudado enzimático para tejidos (ver, por ejemplo, patente US nº 6,258,590).

15 [0321] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar en aplicaciones de detergente para ropa en combinación con otras funciones enzimáticas (ver, por ejemplo, patente US nº 5,696,068).

Péptido señal

20 [0322] La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal que comprende o consiste en aminoácidos 1 a 19 de SEC ID n.º: 2.

El polinucleótido puede comprender además un gen que codifica una proteína, que es operativamente enlazado al péptido señal.

La proteína es preferiblemente extranjera al péptido señal.

25 En un aspecto, el polinucleótido para el péptido señal es nucleótidos 1 a 57 de SEC ID n.º: 1.

2. La presente invención también se refiere a métodos de producción de una proteína, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido que codifica un péptido señal que comprende o que consiste de aminoácidos 1 a 19 de SEC ID n.º: 2., donde el gen es extranjero al polinucleótido bajo condiciones propicias para la producción de la proteína; y (b) recuperación de la proteína.

30

[0323] La proteína puede ser nativa o heteróloga a una célula huésped.

35 El término "proteína" no se utiliza aquí para referirse a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos, y polipéptidos.

El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado.

Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos y polipéptidos fusionados.

40 [0324] Preferiblemente, la proteína es una hormona o variante de la misma, enzima, receptor o porción de lo mismo, anticuerpo o porción de lo mismo, o reportero.

Por ejemplo, la proteína puede ser una oxidorreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, o ligasa tal como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, otra lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa.

45

[0325] El gen puede ser obtenido de cualquier procariótico, eucariota, u otra fuente.

50 [0326] La presente invención es posteriormente descrita por los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Materiales

55 [0327] Productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Cepas

60 [0328] Cepa de *Trichophaea saccata* CBS 804.70 fue usada como la fuente de un gen que codifica una familia GH10 xilanasa.

Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3,112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3 prb1::LEU2; cir⁺) fue usada para selección de bibliotecas de expresión para actividad de xilanasa *Trichophaea saccata* cepa CBS 804.70.

65

Cepa de *Aspergillus oryzae* BECh2 (negativo de alfa-amilasa) fue usada para la expresión del gen *Trichophaea saccata* gh10a.

Medios y soluciones

- 5 [0329] Placas PDA fueron compuestas de 39 g de agar de dextrosa de patata y agua desionizada a 1 litro.
- 10 [0330] MEX-1 medio fue compuesto por 20 g de harina de semilla de soja, 15 g de salvado de trigo, 10 g de celulosa microcristalina (AVICEL®; FMC, Philadelphia, PA, USA), 5 g de maltodextrina, 3 g de bactopectona, 0.2 g de plurónico, 1 g de aceite de oliva, y agua desionizada a 1 litro.
- [0331] Medio LB fue compuesto por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, y 5 g de cloruro sódico, y agua desionizada a 1 litro.
- 15 [0332] Medio de ampicilina LB fue compuesto por 50 mg de ampicilina (filtro esterilizado, añadido tras la autoclave) por litro de medio LB.
- [0333] Placas de ampicilina LB fueron compuestas de 15 g de bacto agar por litro de medio de ampicilina LB.
- 20 [0334] Medio YPD fue compuesto por 1% extracto de levadura, 2% peptona, y 2% glucosa esterilizada por filtro añadida tras la autoclave.
- [0335] Medio SC-URA con glucosa o galactosa fue compuesto por 100 ml de 10X sales Basales, 25 ml de 20% ácidos de casamino sin vitaminas, 10 ml de 1% triptófano, 4 ml de 5% treonina (esterilizada por filtro, añadida tras la autoclave), y 100 ml de 20% glucosa o 100 ml de 20% galactosa (esterilizada por filtro, añadido tras la autoclave), y agua desionizada a 1 litro.
- 25 [0336] 10X solución de sales Basales fue compuesta por 75 g de base nitrogenada de levadura, 113 g de ácido succínico, 68 g de NaOH, y agua desionizada a 1 litro.
- 30 [0337] Placas agar de SC fueron compuestas de 20 g de agar por litro de medio SC-URA (con glucosa o galactosa como indicado).
- [0338] 0,1 % placas de agar SC-URA de xilano de AZCL con galactosa fueron compuestas de 20 g de agar por litro de medio SC-URA con galactosa y 0,1% xilano de avena de AZCL, (Megazyme, Wicklow, Irlanda).
- 35 [0339] Medio SC-URA con galactosa fue compuesto por 900 ml de Agar SC-Grund (sometido a autoclave), 4 ml de 5% treonina (esterilizada por filtro), y 100 ml de 20% galactosa (esterilizado por filtro).
- 40 [0340] Agar SC-Grund fue compuesto por 7,5 g base nitrogenada de levadura (sin aminoácidos), 11,3 g de ácido succínico, 6,8 g de hidróxido sódico, 5,6 g de ácidos de casamino, 0,1 g de L-triptófano, 20 g de agar, y agua desionizada a 1 litro.
- 45 [0341] Placas de COVE fueron compuestas de 342,3 g de sacarosa, 25 g de agar Noble, 20 ml de solución de sales de COVE, 10 mM acetamida, 20 mM CsCl, y agua desionizada a 1 litro. La solución fue ajustada a pH 7.0 antes de la autoclave.
- [0342] Solución de sales de COVE fue compuesto por 26 g de KCl, 26 g de MgSO₄·7H₂O, 76 g de KH₂PO₄, 50 ml de solución de metales traza de COVE, y agua desionizada a 1 litro.
- 50 [0343] Solución de metales traza de COVE fue compuesta por 0,04 g de NaB₄O₇·10H₂O, 0,4 g de CuSO₄·5H₂O, 1,2 g de FeSO₄·7H₂O, 0,7 g de MnSO₄·H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₂·2H₂O, 10 g de ZnSO₄·7H₂O, y agua desionizada a 1 litro.
- 55 [0344] Medio MDU2BP fue compuesto de 45 g de maltosa, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 1 g de NaCl, 2 g de K₂SO₄, 12 g de KH₂PO₄, 7 g de extracto de levadura, 2 g de urea, 0,5 ml de solución de metales traza de AMG; pH 5.0, y agua desionizada a 1 litro.
- 60 [0345] Solución de metales traza de AMG fue compuesta por 14,3 g de ZnSO₄·7H₂O, 2,5 g de CuSO₄·5H₂O, 0,5 g de NiCl₂·6H₂O, 13,8 g de FeSO₄·7H₂O, 8,5 g de MnSO₄·7H₂O, 3 g de ácido cítrico, y agua desionizada a 1 litro.
- Ejemplo 1: construcción de bibliotecas de expresión de *Trichophaea saccata* CBS 804.70 ADNc en *Saccharomyces cerevisiae*
- 65 [0346] *Trichophaea saccata* CBS 804.70 fue inoculada sobre una placa PDA e incubada durante 7 días a 28°C.

Diferentes tapones de agar de micelios-PDA fueron inoculados en frascos de agitación de 750 ml con 100 ml de MEX-1 medio.

Los matraces fueron agitados a 150 r.p.m. durante 9 días a 37°C.

5 Los micelios fúngicos fueron cosechados por filtración a través de MIRACLOTH® (Calbiochem, San Diego, CA, US) antes de ser congelados en el nitrógeno líquido.

Los micelios fueron luego pulverizados en un polvo por fresado de los micelios congelados junto con un volumen igual de hielo seco en un molinillo preenfriado con nitrógeno líquido.

El polvo fue transferido en un mortero prehelado de nitrógeno líquido y mano de mortero y molido a un polvo fino con una pequeña cantidad de arena cuarzosa horneada.

10 El material micelial en polvo fue mantenido a -80°C hasta su uso.

[0347] ARN total fue obtenido a partir del micelio en polvo congelado de *Trichophaea saccata* CBS 804.70 por extracción con tiocianato de guanidinio seguida de ultracentrifugado a través de un 5.7 M cojin CsCl según Chirgwin *et al.*, 1979, *Biochemistry* 18: 5294-5299. The polyA enriched RNA was isolated by oligo (dT)-cellulose affinity chromatography according to Aviv *et al.*, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412.

[0348] ADNc bicatenario fue sintetizado según los métodos generales de Gubler and Hoffman, 1983, *Gene* 25: 263-269; Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; and Kofod *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 29182-29189, using a polyA-*Not I* primer (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA).

20 Después de la síntesis, el ADNc fue tratado con nucleasa de la judía de Mung, extremado romo con T4 DNA polimerasa, y ligado a un exceso molar de 50-pliegue de adaptadores Eco RI (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). El ADNc fue dividido con *Not I* y el ADNc fue fraccionado en tamaño por 0,8% electroforesis en gel de agarosa utilizando búfer 44 mM Tris base, 44 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA (TBE).

25 La fracción de ADNc de 700 bp y mayor fue extirpada del gel y purificada utilizando un GFX® PCR DNA y Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, United Kingdom) según las instrucciones del fabricante.

[0349] El ADNc direccional fraccionado en tamaño fue ligado en *Eco RI-Not I* dividida pYES 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

30 Las reacciones de ligamiento fueron realizadas por incubación a 16°C durante 12 horas, luego calentando a 70°C durante 20 minutos, y finalmente añadiendo 10 µl de agua para cada tubo.

Un µl de cada mezcla de ligamiento fue sometida a electroporación en 40 µl de células electrocompetente *E. coli* DH10B (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) como descrito por Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

35 [0350] La biblioteca de *Trichophaea saccata* CBS 804.70 fue establecida en depósitos consistentes en *E. coli*. Cada depósito fue hecho por *E. coli* transformado de extensión en las placas de ampicilina LB, produciendo 15.000-30.000 colonias/placa tras la incubación a 37°C durante 24 horas.

Veinte ml de medio LB se añadieron a la placa y las células fueron suspendidas ahí.

La suspensión celular fue agitada en un tubo de 50 ml durante 1 hora a 37°C.

40 [0351] ADN plásmido de varios de los depósitos de biblioteca de *T. saccata* CBS 804.70 fue aislado utilizando un Midi Plasmid Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA), según las instrucciones del fabricante, y almacenado a -20°C.

Ejemplo 2: selección de bibliotecas de expresión de *Trichophaea saccata* CBS 804.70 para actividad de xilanasas

45 [0352] Un µl partes alícuotas de ADN plásmido purificado de varios de los depósitos de biblioteca fueron transformadas en el *S. cerevisiae* W3124 por electroporación (Becker and Guarante, 1991, *Methods Enzymol.* 194: 182-187) y los transformantes fueron colocados sobre placas agar de SC con 2% glucosa e incubados a 30°C.

En total, 50- 100 placas conteniendo 250-400 colonias de levadura fueron obtenidas de cada depósito.

50 Después de 3-5 días de incubación, las placas de agar SC fueron colocadas en replica en placa sobre un conjunto de placas de agar SC-URA de (avena) de xilano de AZCL 0,1% con galactosa.

Las placas fueron incubadas durante 2-4 días a 30°C y colonias positivas de xilanasas fueron identificadas como colonias rodeadas por un halo azul.

Los clones positivos fueron purificados streak y obtenidos como colonias individuales.

55 Ejemplo 3: caracterización del gen *Trichophaea saccata* CBS 804.70 *gh10a*

[0353] Colonias de levadura de expresión de xilanasas fueron inoculadas en 5 ml de medio YPD en tubos de 25 ml.

Los tubos fueron agitados durante toda la noche a 30°C.

60 Un ml del cultivo fue centrifugado para granular las células de levadura.

[0354] ADN fue aislado según WO 94/14953 y disuelto en 50 µl de agua.

El ADN fue transformado en el *E. coli* DH10B usando procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

65 [0355] ADN plásmido fue aislado de los transformantes de *E. coli* usando procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Plásmidos fueron ordenados utilizando ambos cebadores de pYES como cebadores de secuenciación. Se descubrió que un clon de plásmido específico de 1283 bp designado TF12Xyl170 codificaba una proteína de glicósido hidrolasa de familia 10 y fue ulteriormente caracterizado.

Secuencia más fiable se obtuvo por otra secuenciación del fragmento que utiliza los cebadores específicos mostrados debajo diseñada basadas en la secuencia inicial:

5 TF12Xyl170F1:
5'-TGAAATGGGATGCTACTGA- (SEC ID n.º: 3)
TF12Xyl170F2:
5'-CAACGACTACAACATCGAGG- (SEC ID n.º: 4)
10 TF12Xyl170R1:
5'-ATTTGCTGTCCACCAGTGAA- (SEC ID n.º: 5)

[0356] Un plásmido que coincide con la secuencia de ADNc original fue designado pTF12Xyl170 y la cepa de *E. coli* que contiene este clon fue designado *E. coli* pTF12Xyl170 y depositado el 28 de julio de 2009, con la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, Peoria, IL, USA, y asignado el número de registro NRRL B-50309.

[0357] La secuencia de nucleótidos (SEC ID n.º: 1) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n.º: 2) del gen *Trichophaea saccata gh10a* se muestran en la figura 1.

La secuencia que codifican es 1197 pb con el codón de terminación.

La proteína predicha codificada contiene 398 aminoácidos.

El %G+C de la región de codificación del gen es 53,6% y la región de codificación de polipéptido maduro es también 53,6%.

usando el programa SignalP, versión 3 (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 19 residuos fue predicho.

La proteína madura predicha contiene 379 aminoácidos con una masa molecular predicha de 40,4 kDa.

[0358] Análisis de la secuencia de aminoácidos deducida del gen *gh10a* con el programa Interproscan (Zdobnov and Apweiler, 2001, Bioinformatics 17: 847-848) mostró que la proteína GH10A contenía la secuencia de núcleo típico de una glicósido hidrolasa de familia 10, extendiéndose de aproximadamente residuo de aminoácido 65 a residuo 377 del polipéptido maduro predicho.

La proteína GH10A también contenía la firma de secuencia de un dominio de enlace tipo I a la celulosa fúngico (CBMI).

Esta firma de secuencia conocida como Prosite Entry PS00562 (Sigrist *et al.*, 2002, Brief Bioinform. 3: 265-274) estuvo presente de residuo de aminoácido 8 a residuo 35 del polipéptido maduro predicho.

[0359] Un alineamiento global comparativo por pares de secuencias de aminoácidos fue determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa Needlede EMBOSS con penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y el EBLOSUM62 matriz.

La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen *Trichophaea saccata* que codifica el polipéptido GH10A maduro compartía 62,6% y 62,0% en identidad (espacios de exclusión) a las secuencias de aminoácidos deducidas de proteínas de glicósido hidrolasa de familia 10 de *Phanerochaete chrysosporium* y *Meripilus giganteus*, respectivamente (números de registro UNIPROT:B7SIW2 y GENESEQP:AAW23327, respectivamente).

Ejemplo 4: expresión del gen de *Trichophaea saccata* CBS 804.70 *gh10a* en el *Aspergillus oryzae*

[0360] El gen de *Trichophaea saccata* CBS 804.70 *gh10a* fue extirpado de pTF12xyl170 que usa *Bam* HI y *Xho* I, y ligado en el vector de expresión *Aspergillus* pDAu109 (WO 2005/042735), también digerido con *Bam* HI y *Xho* I, que usa métodos estándar (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

La reacción de ligamiento fue transformada en células químicamente competentes *E. coli* TOP10 según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Ocho colonias fueron cultivadas durante toda la noche en el medio de ampicilina LB y ADN plásmido fue aislado utilizando un QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU) según las direcciones del fabricante.

Plásmidos con los insertos de tamaño correcto fueron ordenados para determinar integridad y orientación de los insertos.

Plamídico pDAu81#5 resultó estar libre de error y fue por lo tanto elegido para crecimiento en escala.

[0361] Protoplastos de *Aspergillus oryzae* BECH2 fueron preparados como se describe en WO 95/02043.

A. Oryzae BECH2 fue construido como se describe en WO 00/139322.

Cien microlitros de suspensión de protoplasto fueron mezclados con 5-25 µg del vector de expresión *Aspergillus* pDAu81#5 en 10 µl de STC compuesto por 1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂ (Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422).

La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 25 minutos.

Doscientos microlitros de 60% PEG 4000 (BDH, Poole, Inglaterra) (glicol de polietileno, peso molecular 4.000), 10 mM CaCl₂, y 10 mM Tris-HCl pH 7,5 fueron añadidos y suavemente mezclados y finalmente 0,85 ml de la misma solución fueron añadidos y suavemente mezclados.

La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 25 minutos y luego fue centrifugada a 2,500 x g durante 15 minutos.

El granulado fue resuspendido en 2 ml de 1,2 M sorbitol.

Este proceso de sedimentación fue repetido, y los protoplastos fueron extendidos en las placas de COVE.

Tras la incubación durante 4-7 días a 37°C esporas fueron escogidas y extendidas en las placas de COVE con 0,01% TRITON® X-100 para aislar colonias individuales.

La extensión fue repetida dos veces más en el medio de sacarosa de COVE (Cove, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133: 51-56) con 1 M sacarosa y 10 mM nitrato sódico.

[0362] Diez de los transformantes fueron cada uno inoculado en 10 ml de medio YPG.

Después de 3-4 días de incubación a 30°C, 200 r.p.m., sobrenadantes fueron quitados y analizados por geles SDS-PAGE 10% Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) como recomendado por el fabricante.

Geles fueron manchados con azul Coomassie y todos los aislados mostraron una banda difusa entre 35 y 45 kDa.

Estos transformantes fueron analizados además para actividad de xilanasa a pH 6.0 utilizando un AZCL-arabinoxilano modificado como sustrato (trigo; Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Ireland) en 0,2 M búfer de fosfato sódico pH 6.0 con 0,01% TRITON® X-100 según las instrucciones del fabricante.

El transformante que produce el nivel máximo de actividad fue elegido para la producción de la xilanasa.

[0363] El transformante que produce el nivel máximo de actividad fue cultivado utilizando los métodos estándar.

El caldo fue filtrado utilizando filtros Whatmann de vidrio GF/D, GF/A, GF/C, GF/F (2,7 µm, 1,6 µm, 1,2 µm y 0,7 µm, respectivamente) (Whatman, PISCATAWAY, NJ, USA) seguido de filtración que utiliza un filtro de botella superior de NALGENE® 0,45 µm (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA).

[0364] Sulfato de amoníaco se añadió al caldo filtrado a una concentración final de 3 M y el precipitado fue recogido tras la centrifugación a 10,000 x g durante 30 minutos.

El precipitado fue disuelto en 10 mM Tris/HCl pH 8.0 y dializado contra 10 mM Tris/HCl pH 8.0 durante toda la noche.

La preparación dializada fue aplicada a 150 ml de columna Q SEPHAROSE® Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrado con 10 mM Tris/HCl pH 8.0 y la enzima fue eluida con un gradiente de sal lineal 1050 ml (7 volúmenes de columna) de 0 a 1 M NaCl en 10 mM Tris/HCl pH 8.0.

La elución fue seguida a 280 nm y fracciones fueron recogidas y evaluadas para buscar actividad de xilanasa utilizando 0,2% AZCL-arabinoxilano de trigo en 0,2 M pH de búfer de fosfato sódico 6,0 conteniendo 0,01% TRITON® X-100 a 37°C.

Fracciones que contienen actividad de xilanasa fueron agrupadas y almacenado a -20°C.

Ejemplo 5: preparación de celobiohidrolasa I de *Aspergillus fumigatus* NN055679 Cel7A

[0365] Una búsqueda tfasty (Pearson et al., 1997, Genomics 46:24-36) de la secuencia de genoma parcial de *Aspergillus fumigatus* (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD) fue realizada utilizando como pregunta una secuencia de proteína de celobiohidrolasa Cel7 de *Trichoderma reesei* (registro nº P00725).

Diferentes genes fueron identificados como homólogos putativos de familia GH7 basados en un grado alto de similitud a la secuencia de pregunta en el nivel aminoácido.

Una región genómica con identidad significativa a la secuencia de pregunta fue elegida para otro estudio, y el gen correspondiente fue denominado cel7A.

[0366] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados debajo fueron diseñados para amplificar PCR un gen de celobiohidrolasa I *Aspergillus fumigatus* NN055679 cel7A (SEC ID n.º: 6 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 7 [secuencia de aminoácidos deducida]) de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus* preparado como se describe en WO 2005/047499.

Cebador directo:

5'-gggcATGCTGGCCTCCACCTTCTCC- (SEC ID n.º: 8)

Cebador inverso:

5'-gggtaattaaCTACAGGCACTGAGAGTAA- (SEC ID n.º: 9)

[0367] Las mayúsculas representan la secuencia codificadora.

El resto de la secuencia proporciona sitios de endonucleasa de restricción para *Sph* I y *Pac* I en las secuencias directa e inversa, respectivamente.

Usando estos cebadores, el gen cel7A de *Aspergillus fumigatus* fue amplificado utilizando métodos PCR estándar y el producto de reacción aislado por 1% electroforesis en gel de agarosa utilizando 40 mM Tris base-20 mM sodio acetate-1 mM búfer de (TAE) de EDTA disodio y purificado utilizando un OIAQUICK® Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) según las instrucciones del fabricante.

[0368] El fragmento fue digerido con *Sph* I y *Pac* I y ligado en el vector de expresión pAILo2 (WO 2004/099228) también digerido con *Sph* I y *Pac* I según procedimientos estándar.

Los productos de ligamiento fueron transformados en células de SOLOPACK® *E. coli* XL10 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) según las instrucciones del fabricante.

5 Un transformante de *E. coli* con un plásmido del tamaño correcto fue detectado por digestión de restricción y ADN plásmido fue preparado utilizando un BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

Secuenciación del ADN del gen de inserto de este plásmido fue realizada con un secuenciador Perkin-Elmer Applied Biosystems Model 377 XL Automated DNA Sequencer (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) usando química de terminador de coloración (Giesecke *et al.*, 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60) y estrategia de paseo con cebador.

10 Datos de secuencia de nucleótidos fueron escrutinados para calidad y todas las secuencias fueron comparadas entre sí con asistencia de software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).

La secuencia de nucleótidos fue mostrada para encontrar la secuencia genómica determinada por TIGR (SEC ID n.º: 6 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 7 [secuencia de aminoácido deducido]).

15 El plásmido resultante fue denominado pEJG93.

[0369] *Aspergillus oryzae* JaL250 (WO 99/61651) protoplastos fueron preparados según el método de Christensen *et al.*, 1988, *supra* y transformado con 5 µg de pEJG93 (así como pAILo2 como un control de vector).

La transformación liberó aproximadamente 100 transformantes.

20 Diez transformantes fueron aislados a placas PDA individuales.

[0370] Placas PDA confluyentes de cinco de los diez transformantes fueron lavados con 5 ml de 0,01% TWEEN® 20 e inoculadas separadamente en 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml e incubadas a 34°C, 250 r.p.m.

25 Cinco días tras la incubación, 0,5 µl de sobrenadante de cada cultivo fue analizado utilizando geles de tris-glicina 8-16% SDS-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) según las instrucciones del fabricante.

SDS-PAGE perfiles de los cultivos mostraron que uno de los transformantes tenía una gran banda de aproximadamente 70 kDa.

30 Este transformante fue denominado *Aspergillus oryzae* JaL250EJG93.

[0371] Quinientos ml de medio de matraz de agitación fueron añadidos a un 2800 ml matraz de agitación.

El medio de matraz de agitación estaba compuesto por 45 g de maltosa, 2 g de K₂HPO₄, 12g de KH₂PO₄, 1 g de NaCl, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 7 g de extracto de levadura, 2 g de urea, 0,5 ml de solución de oligoelementos, y agua desionizada a 1 litro.

35 La solución de oligoelementos fue compuesto por 13,8 g de FeSO₄·7H₂O, 14,3 g de ZnSO₄·7H₂O, 8,5 g de MnSO₄·H₂O, 2,5 g de CuSO₄·5H₂O, 0,5 g de NiCl₂·6H₂O, 3 g de ácido cítrico, y agua desionizada a 1 litro.

Dos frascos de agitación fueron inoculados con una suspensión de una placa PDA de *Aspergillus oryzae* JaL250EJG93 con 0,01% TWEEN® 80 e incubados a 34°C en una coctelera orbital a 200 r.p.m. durante 120 horas.

40 El caldo fue filtrado utilizando un 0,7 µm filtro de vidrio de Whatman GF/F (Whatman, PISCATAWAY, NJ, US) seguido de un 0,22 µm EXPRESS™ Plus Membrane (Millipore, Bedford, MA, USA).

[0372] El caldo filtrado fue concentrado y el búfer fue intercambiado por 20 mM Tris-HCl pH 8.5 usando un concentrador de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA, USA) equipado con una membrana 10 kDa de polietersulfona (Pall Filtron, Northborough, MA, USA).

45 Concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 6: preparación de celobiohidrolasa II de *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65 Cel6A

50 [0373] La celobiohidrolasa II de *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65 Cel6A (SEC ID n.º: 10 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 11 [secuencia de aminoácidos deducida]) se obtuvo según el procedimiento descrito abajo.

[0374] Cien ml de medio de matraz de agitación se añadieron a unmatraz de agitación 500 ml.

55 El medio de matraz de agitación fue compuesto por 15 g de glucosa, 4 g de K₂HPO₄, 1 g de NaCl, 0,2 g de MgSO₄·7H₂O, 2 g de ácido libre de MES, 1 g de bacto-peptona, 5 g de extracto de levadura, 2,5 g de ácido cítrico, 0,2 g de CaCl₂·2H₂O, 5 g de NH₄NO₃, 1 ml de solución de oligoelementos, y agua desionizada a 1 litro.

La solución de oligoelementos fue compuesta por 1,2 g de FeSO₄·7H₂O, 10 g de ZnSO₄·7H₂O, 0,7 g de MnSO₄·H₂O, 0,4 g de CuSO₄·5H₂O, 0,4 g de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₄·2H₂O, y agua desionizada a 1 litro.

60 El matraz de agitación fue inoculado con dos tapones de un cultivo de placa sólida de cepa de *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65 e incubado a 45°C con agitación a 200 r.p.m. durante 48 horas.

Cincuenta ml del caldo de matraz de agitación fue usado para inocular un vaso de fermentación de 2 litros.

[0375] Medio de lote de fermentación fue compuesto por 5 g de extracto de levadura, 176 g de celulosa en polvo, 2 g de glucosa, 1 g de NaCl, 1 g de bacto-peptona, 4 g de K₂HPO₄, 0,2 g de CaCl₂·2H₂O, 0,2 g de MgSO₄·7H₂O, 2,5 g de ácido cítrico, 5 g de NH₄NO₃, 1,8 ml de anti espuma, 1 ml de solución de oligoelementos (encima), y agua desionizada a 1 litro.

65

El medio de alimentación de fermentación fue compuesto por agua y antiespuma.

[0376] Un total de 1,8 litros del medio de lote de fermentación se añadió a un fermentador cubierto de vidrio de 2 litrow (Applikon Biotechnology, Schiedam, Netherlands).

Medio de alimentación de fermentación fue dosificado a un ritmo de 4 g/l/hr durante un periodo de 72 horas.

El vaso de fermentación fue mantenido a una temperatura de 45°C y pH fue controlado utilizando un sistema de control de Applikon 1030 (Applikon Biotechnology, Schiedam, Netherlands) a un punto de ajuste de 5.6 +/- 0.1.

Aire se añadió al vaso a un ritmo de 1 vvm y el caldo fue agitado por impulsor Rushton rotativo a 1100 a 1300 r.p.m.

Al final de la fermentación, caldo completo fue cosechado del vaso y centrifugado a 3000 x g para eliminar el biomasa.

[0377] El caldo cosechado obtenido arriba fue centrifugado en botellas de 500 ml a 13,000 x g durante 20 minutos a 4°C y luego filtrado estéril utilizando una membrana de polietersulfona de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, USA).

El caldo filtrado fue concentrado y intercambiado búfer por 20 mM Tris-HCl 8.5 pH que utiliza un concentrador de flujo tangencial equipado con una membrana de polietersulfona 10 kDa a aproximadamente 20 PSI.

Para reducir la cantidad de pigmento, el concentrado se aplicó a una columna Q SEPHAROSE™ Big Bead 60 ml (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, USA) equilibrado con 20 mM Tris-HCl pH 8.5, y eluido a paso con búfer de equilibrado con 600 mM NaCl.

Flujo pasante y fracciones de eluato fueron analizados en geles 8-16% CRITERION® SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) manchados con reactivo de mancha de azul de GELCODE® (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

La fracción de flujo pasante contuvo la celobiohidrolasa Cel6A de *Myceliophthora thermophila* según lo juzgado por la presencia de una banda correspondiente al peso molecular aparente de la proteína por SDS-PAGE (aproximadamente 75 kDa).

[0378] La fracción de flujo pasante fue concentrada utilizando un dispositivo de ultrafiltración (Millipore, Bedford, MA, USA) equipado con una membrana de polietersulfona 10 kDa a 40 PSI, 4°C y mezclada con un volumen igual de 20 mM Tris-HCl pH 7.5 con 3,4 M de sulfato amónico para una concentración final de 1,7 M de sulfato amónico.

La muestra fue filtrada (0,2 µM filtro de jeringa, membrana de polietersulfona, Whatman, Maidstone, United Kingdom) para eliminar material granuloso antes de la carga sobre una columna de PHENYL SUPEROSE™ (HR 16/10, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrada con 1,7 M de sulfato amónico en 20 mM Tris-HCl 7.5 pH.

Proteínas ligadas fueron eluidas con un gradiente de sal decreciente de volumen de columna 12 de 1,7 M de sulfato amónico a 0 M sulfato amónico en 20 mM Tris-HCl 7.5 pH.

Fracciones fueron analizadas por electroforesis 8-16% SDS-PAGE en gel como se ha descrito anteriormente, que reveló que la celobiohidrolasa Cel6A de *Myceliophthora thermophila* eludió al final del gradiente (aproximadamente 20 mM sulfato de amonio).

[0379] Fracciones con la celobiohidrolasa II Cel6A fueron agrupadas y diluidas 10-plegues en 20 mM Tris-HCl 9.0 pH (para bajar la sal y aumentar el pH) y luego aplicadas a una columna 1 ml RESOURCE™ Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrada con 20 mM Tris-HCl 9.0 pH.

Proteínas ligadas fueron eluidas con un gradiente de sal de volumen de columna 20 de 0 mM a 550 mM NaCl en 20 mM Tris-HCl 9.0 pH.

Celobiohidrolasa II de *M. Thermophila* Cel6A eludió como un valor máximo único temprano en el gradiente (aproximadamente 25 mM NaCl).

La celobiohidrolasa II fue >90% puro según juzgado por SDS-PAGE.

Concentraciones de proteína fueron determinadas utilizando un BCA Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 7: preparación de endoglucanasa I Cel7B de *Trichoderma reesei* RutC30

[0380] Endoglucanasa I RutC30 Cel7B de *Trichoderma reesei* (EGI) (SEC ID n.º: 12 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 13 [secuencia de aminoácido deducido]) se preparó de forma recombinante según WO 2005/067531 que usa *Aspergillus oryzae* JaL250 como un huésped.

[0381] El caldo cosechado fue centrifugado en botellas de 500 ml a 13,000 x g durante 20 minutos a 4°C y luego filtrado estéril utilizando una membrana de polietersulfona de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, USA).

El caldo filtrado fue concentrado y búfer intercambiado por 20 mM Tris-HCl 8.5 pH utilizando un concentrador de flujo tangencial equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa.

La muestra fue cargada sobre una columna Q SEPHAROSE® High Performance (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrada con 20 mM Tris-HCl 8.5 pH, y eluida de paso con búfer de equilibrado conteniendo 600 mM de NaCl.

Flujo pasante y fracciones de eluato fueron analizados por SGS-PAGE utilizando un sistema de formación de imágenes sin manchas de CRITERION™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Las fracciones de eluato que contienen Cel7B EGI de *Trichoderma reesei* fueron agrupadas, concentradas y búfer cambiadas a 20 mM Tris-HCl 8.5 pH.

La concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 8: preparación de endoglucanasa II Cel5A de *Myceliophthora thermophila* CBS 202.75

[0382] Endoglucanasa II CBS 202.75 Cel5A de *Myceliophthora thermophila* (EGII) (SEC ID n.º: 14 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 15 [secuencia de aminoácido deducido]) se preparó de forma recombinante según WO 2007/109441 usando *Aspergillus oryzae* HowB104 como un huésped.

[0383] El filtrado de cultivo fue desalado y cambiado búfer a 20 mM Tris pH 8.0 usando una columna de desalación HIPREP® 26/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) según las instrucciones del fabricante.

La muestra cambiada de protección fue aplicada a una columna MonoQ® (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrada con 20 mM Tris pH 8.0, y la proteína ligada fue eluida con un gradiente de 0 a 500 mM de cloruro sódico. Fracciones fueron agrupadas y concentradas en 20 mM Tris pH 8.0.

La concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 9: preparación de polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC 0583 que tiene actividad de mejora celulolítica

[0384] Polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC 0583 que tiene actividad de mejora celulolítica (SEC ID n.º: 16 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 17 [secuencia de aminoácido deducido]) fue preparado de forma recombinante según WO 2005/074656 usando *Aspergillus oryzae* JaL250 como un huésped.

El polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* de forma recombinante producido fue primero concentrado por ultrafiltración que utiliza una membrana de 10 kDa, búfer cambiado a 20 mM Tris-HCl pH 8.0, y luego purificado utilizando una Q columna de 100 ml de perlas grandes de SEPHAROSE® con 600 ml de un gradiente lineal de 0-600 mM de NaCl en el mismo búfer.

Fracciones de 10 ml fueron recogidas y agrupadas basadas en SDS-PAGE.

[0385] Las fracciones agrupadas (90 ml) fueron luego purificadas además utilizando una columna MONO Q® de 20 ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) con 500 ml de un gradiente lineal de 0-500 mM de NaCl en lo mismo búfer.

Fracciones de 6 ml fueron recogidas y agrupadas basándose en SDS-PAGE.

Las fracciones agrupadas (24 ml) fueron concentradas por ultrafiltración que utiliza una membrana 10 kDa, y cromatografiadas utilizando una columna de 320 ml SUPERDEX® 75 SEC (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, US) con elución isocrática de aproximadamente 1,3 litros de 150 mM NaCl-20 mM Tris-HCl pH 8.0.

Fracciones de 20 ml fueron recogidas y agrupadas basándose en SDS-PAGE.

Concentración de proteína fue determinada usando un equipo de ensayo de proteína de BCA™ de microplaca donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 10: preparación de polipéptido GH61E de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 que tiene actividad de mejora celulolítica

[0386] Polipéptido GH61E de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 que tiene actividad de mejora celulolítica (SEC ID n.º: 18 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 19 [secuencia de aminoácido deducido]) fue preparado de forma recombinante según patente US n.º 7,361,495 usando *Aspergillus oryzae* JaL250 como un huésped.

[0387] Caldo de cultivo filtrado fue desalado y cambiado búfer a 20 mM de sodio acetate-150 mM de NaCl pH 5.0 usando una columna HIPREP® 26/10 de desalación según las instrucciones del fabricante.

Concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit de microplaca donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 11: preparación de beta-glucosidasa Cel3A de *Penicillium brasilianum* IBT 20888

[0388] Beta-glucosidasa Cel3A de *Penicillium brasilianum* IBT 20888 (SEC ID n.º: 20 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 21 [secuencia de aminoácido deducido]) fue preparado de forma recombinante según WO 2007/019442 usando *Aspergillus oryzae* como un huésped.

[0389] El caldo filtrado fue concentrado y cambiado búfer utilizando un concentrador de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA, USA) equipado con una membrana 10 kDa de polietersulfona (Pall Filtron, Northborough, MA, USA) con 20 mM de Tris-HCl pH 8.0.

La muestra fue cargada sobre una columna Q SEPHAROSE® High Performance equilibrada en 20 mM Tris pH 8.0, y proteínas enlazadas fueron eluidas con un gradiente de 0-600 mM cloruro sódico.

Las fracciones fueron concentradas en 20 mM Tris pH 8.0.

Concentración de proteína fue determinada usando un equipo de ensayo de proteína de BCA™ de microplaca donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 12: ensayo de hidrólisis de rastrojos de maíz pretratados

- [0390] Rastrojos de maíz fueron pretratados en U.S. Department of Energy National Renewable Energy Laboratory (NREL) utilizando 1,4 % en peso de ácido sulfúrico a 165°C y 107 PSI durante 8 minutos. Los sólidos insolubles en agua en los rastrojos de maíz pretratados (PCS) contenían 56,5% celulosa, 4,6% hemicelulosa y 28,4% lignina. Celulosa y hemicelulosa fueron determinadas por una hidrólisis de ácido sulfúrico de dos etapas con análisis posterior de azúcares por cromatografía líquida de alto rendimiento que usa procedimiento NREL Standard Analytical Procedure #002. Lignina fue determinada gravimétricamente TRAS hidrolizaR laS fracciones de celulosa y hemicelulosa con ácido sulfúrico que usa procedimiento NREL Standard Analytical Procedure #003.
- [0391] PCS No-molido, sin lavar (PCS acuoso entero) se preparó por ajuste de del pH de PCS a 5.0 por adición de 10 M NaOH con mezcla extensa, y luego autoclave durante 20 minutos a 120°C. El peso en seco del PCS acuoso entero fue 29%. El PCS fue usado sin lavar o lavado con agua. PCS sin lavar molido (peso en seco 32,35%) se preparó moliendo PCS acuoso entero en un desfibrador multi-utalidad mojado Cosmos ICMG 40 (EssEmm corporación, Tamil Nadu, India). PCS lavado molido (peso en seco 32,35%) se preparó de la misma manera, con lavado posterior con agua desionizada y decantación fuera de la fracción sobrenadante reiteradamente.
- [0392] La hidrólisis de PCS fue conducida utilizando placas de pozos profundos 2,2 ml (Axygen, Union City, CA, USA) en un volumen de reacción total de 1,0 ml. La hidrólisis fue realizada con 50 mg de PCS (sólidos insolubles en caso de sólidos PCS sin lavar y total en caso de PCS lavado) por ml de 50 mM búfer de acetato sódico pH 5.0 que contiene 1 mM sulfato de manganeso y varias cargas de proteína de varias composiciones enzimáticas (expresadas como mg proteína por gramo de celulosa). Composiciones enzimáticas fueron preparadas y luego añadidas simultáneamente a todos los pocillos en un volumen que varía de 50 µl a 200 µl, para un volumen final de 1 ml en cada reacción. La placa fue luego sellada utilizando un sellador de calor de placa de ALPS-300™ (Abgene, Epsom, United Kingdom), mezclada íntegramente, e incubada a una temperatura específica durante 72 horas. Todos los experimentos proporcionados fueron realizados por triplicado.
- [0393] Tras la hidrólisis, muestras fueron filtradas utilizando una placa de filtración de 0,45 µm de 96 pocillos MULTISCREEN® (Millipore, Bedford, MA, USA) y filtrados analizados para contenido de azúcar como se describe abajo. Cuando no se usaron inmediatamente, partes alícuotas filtradas fueron congeladas a -20°C. Las concentraciones de azúcar de muestras diluidas en 0,005 M H₂SO₄ fueron medidos utilizando una columna 4.6 x 250 mm AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) por elución con 0,05% p/p ácido benzoico-0,005 M H₂SO₄ a 65°C a una velocidad de flujo de 0,6 ml por minuto, y cantidad por integración de la glucosa, celobiosa, y señales de xilosa de detección de índice de refracción (CHEMSTATION®, HPLC de AGILENT® 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) calibrado por muestras de azúcar puro. La glucosa resultante y equivalentes de celobiosa fueron usados para calcular el porcentaje de conversión de celulosa para cada reacción.
- [0394] Glucosa, celobiosa, y xilosa fueron medidas individualmente. Concentraciones de azúcar medidas fueron ajustadas para el factor de dilución apropiada. En caso de PCS sin lavar, las concentraciones netas de azúcares producidos enzimáticamente fueron determinadas por ajuste de las concentraciones de azúcar medido para concentraciones de azúcar de antecedentes correspondientes en PCS sin lavar en el punto de tiempo cero. Todo procesamiento de datos de HPLC fue realizado usando el software MICROSOFT EXCEL™ (Microsoft, Richland, WA, USA).
- [0395] El grado de conversión de celulosa para glucosa fue calculado utilizando la ecuación siguiente: % conversión = concentración de glucosa / concentración de glucosa en una asimilación de límite. Para calcular conversión total, valores de glucosa y celobiosa fueron combinados. Concentración de celobiosa fue multiplicada por 1,053 para convertirse en equivalentes de glucosa y añadida a la concentración de glucosa. El grado de conversión de celulosa total fue calculado utilizando la ecuación siguiente: % conversión = [concentración de glucosa + 1,053 x (concentración de celobiosa)] / [(concentración de glucosa + 1,053 x (concentración de celobiosa) en una asimilación de límite]. El factor 1,053 para celobiosa toma en consideración el aumento en la masa cuando la celobiosa se convierte en glucosa. Para calcular % conversión, un 100% punto de conversión fue establecido basado en un control de celulasa (50-100 mg de celulasa de *Trichoderma reesei* por gramo de celulosa), y todos los valores fueron divididos por este número y luego multiplicados por 100.

Puntos de datos triplicados fueron calculados según el promedio y desviación típica fue calculada.

Ejemplo 13: evaluación de xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 para sinergia con una composición enzimática de alta temperatura a 50°C, 55°C, y 60°C utilizando PCS lavado molido

[0396] Xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 fue evaluada para sinergia con una composición enzimática de alta temperatura a 50°C, 55°C, y 60°C.

La composición enzimática de alta temperatura incluyó 45% *Aspergillus fumigatus* Cel7A CBHI, 25% *Myceliophthora thermophila* Cel6A CBHII, 5% *Trichoderma reesei* Cel7B EGI, 5% *Myceliophthora thermophila* Cel5A EGII, 5% polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad de mejora celulolítica, 5% polipéptido GH61E de *Thielavia terrestris* que tiene actividad de mejora celulolítica, y beta-glucosidasa de 10% *Penicillium brasilianum* Cel3A.

La xilanasa de *Trichophaea saccata* GH10 fue añadida a 0,35 mg proteína por g celulosa (10%) a la composición enzimática de alta temperatura, que fue cargada a 3,5 mg proteína por g celulosa.

Los resultados para la composición suplementada de xilanasa (3,85 mg proteína por g celulosa) fueron comparados con los resultados para composición no-suplementaria, que fueron evaluados a dos cargas de proteína, 3,5 y 3,85 mg proteína por g celulosa.

[0397] El ensayo fue realizado como se describe en el ejemplo 12.

Las reacciones 1 ml con 5% PCS lavado molido fueron llevadas a cabo durante 72 horas en 50 mM búfer de acetato sódico pH 5.0 con 1 mM sulfato de manganeso.

Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado y e incluyeron mezcla única a principios de hidrólisis.

Los resultados se muestran en la figura 2.

[0398] Xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 mostró una sinergia significativa con la composición enzimática de alta temperatura.

La composición enzimática suplementada con xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 consiguió conversión significativamente más alta de celulosa para glucosa en 72 horas en comparación con composición enzimática de alta temperatura no-suplementaria a una carga de proteína equivalente (3,85 mg proteína por g celulosa).

Ejemplo 14: adición de diferentes niveles de xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 a una carga constante de la composición enzimática de alta temperatura y comparación con celulosa basada en *Trichoderma reesei* SaMe-MF268 (XCL-533)

[0399] La capacidad de xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 para sinergizar con una composición enzimática de alta temperatura a 60°C fue además examinada añadiendo niveles diferentes del xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 (1,25%, 2,5%, 5%, 10%, y 20%) a una carga constante de la composición enzimática de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa).

La composición enzimática de alta temperatura incluyó 45% *Aspergillus fumigatus* Cel7A CBHI, 25% *Myceliophthora thermophila* Cel6A CBHII, 5% *Trichoderma reesei* Cel7B EGI, 5% *Myceliophthora thermophila* Cel5A EGII, 5% polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad de mejora celulolítica, 5% polipéptido GH61E de *Thielavia terrestris* que tiene actividad de mejora celulolítica, y beta-glucosidasa de 10% *Penicillium brasilianum* Cel3A.

La composición enzimática de alta temperatura a 60°C fue comparada con una celulosa SaMe-MF268 (XCL-533) basada en *Trichoderma reesei* a 50°C.

La composición enzimática SaMe-MF268 basada en *Trichoderma reesei* se obtuvo como se describe en WO 2008/151079.

La composición comprende un polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad de mejora celulolítica, una proteína de fusión de beta-glucosidasa que comprende el polipéptido de núcleo de endoglucanasa V de *Humicola insolens* fusionado a la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* tipo salvaje, una celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (Cel7A), una celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei* (Cel6A), una endoglucanasa de *Trichoderma reesei* I (Cel7B), una endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* (Cel5A), una endoglucanasa V de *Trichoderma reesei* (Cel45A), y una endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* (Cel12A).

[0400] El ensayo fue realizado como se describe en el ejemplo 12.

Las reacciones 1 ml con 5% PCS molido lavado fueron conducidas durante 72 horas en 50 mM búfer de acetato sódico pH 5.0 con 1 mM sulfato de manganeso.

Todas reacciones fueron realizadas por triplicado e incluyeron mezcla única a principios de hidrólisis.

[0401] Los resultados mostrados en la figura 3 demostraron que la adición del xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 a la composición enzimática de alta temperatura significativamente mejoró el grado de conversión de celulosa de PCS lavados tras 72 horas de hidrólisis.

El nivel de adición óptima para la xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 fue aproximadamente 5%.

La composición enzimática de alta temperatura suplementada con 5% de xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 consiguió 83% conversión de celulosa en 72 horas en comparación con 65% conversión de celulosa obtenida con

una carga equivalente de la composición enzimática de alta temperatura no-suplementaria (3,15 mg proteína por g celulosa).

Como se muestra en figura 3, la composición enzimática de alta temperatura suplementada con xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 a 60°C significativamente superó la celulasa SaMe-MF268 (XCL-533) basada en *Trichoderma reesei* en su temperatura óptima de 50°C.

Ejemplo 15: comparación de una composición enzimática de alta temperatura que contiene xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 con celulasa basada SaMe-MF268 (XCL-533) en *Trichoderma reesei* en la hidrólisis de PCS lavada y sin lavar.

[0402] En un experimento separado, los perfiles de carga de proteína de la composición enzimática de alta temperatura mejorada que contienen GH10 xilanasa de *Trichophaea saccata* fueron comparados con los perfiles de carga de proteína de celulasa SaMe-MF268 (XCL-533) basada en *Trichoderma reesei* utilizando PCS sin lavar molido y lavado molido.

La composición enzimática de alta temperatura incluyó 45% *Aspergillus fumigatus* Cel7A CBHI, 25% *Myceliophthora thermophila* Cel6A CBHII, 5% *Trichoderma reesei* Cel7B EGI, 5% *Myceliophthora thermophila* Cel5A EGII, 5% polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad de mejora celulolítica, 5% polipéptido GH61E de *Thielavia terrestris* que tiene actividad de mejora celulolítica, 5% *Penicillium brasilianum* Cel3A beta-glucosidasa, y 5% xilanasa *Trichophaea saccata* GH10.

La composición enzimática de alta temperatura y SaMe-MF268 (XCL-533) fueron evaluadas a cinco cargas de proteína diferente, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, y 6,0 mg proteína por g celulosa.

Todas reacciones con la composición enzimática de alta temperatura fueron realizadas a 60°C, mientras todas reacciones con SaMe-MF268 (XCL-533) fueron realizadas a 50°C.

[0403] El ensayo fue realizado como se describe en el ejemplo 12.

Las reacciones de 1 ml con PCS sin lavar molido o lavado molido fueron llevadas a cabo durante 72 horas en 50 mM búfer de acetato sódico pH 5.0 con 1 mM sulfato de manganeso.

PCS lavado fue usado a 5% sólidos totales, y PCS sin lavar fue usado a 5% sólidos insolubles.

Todas reacciones fueron realizadas por triplicado y supusieron mezcla única a principio de hidrólisis.

[0404] Los resultados se muestran en la tabla 1 y figura 4.

La composición enzimática de alta temperatura que contiene xilanasa *Trichophaea saccata* GH10 significativamente superó SaMe-MF268 (XCL-533) en ambos sustratos de PCS lavados y sin lavar, requiriendo cargas de proteína significativamente inferior para conseguir el 80% conversión de celulosa para glucosa en 72 horas en comparación con SaMe-MF268 (XCL-533).

Tabla 1. Cargas de proteína requeridas para conseguir 80% de conversión de celulosa de PCS lavado y sin lavar (mg de proteína por g de celulosa) en 72 horas. Temperatura: 60°C para composición enzimática de alta temperatura, 50°C para SaMe-MF268 (XCL-533).

| Composición enzimática | PCS lavado | PCS sin lavar |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------|
| SaMe-MF268 (XCL-533) | 3,62 | 4,88 |
| Composición enzimática de alta temperatura con xilanasa <i>Trichophaea saccata</i> GH10 | 2,46 | 4,18 |

Depósito de material biológico

[0405] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del Budapest Treaty with the Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, IL, USA, y ha recibido el siguiente del número de registro:

| | | |
|--------------------------|--------------------|---------------------|
| Depósito | Número de registro | Fecha de depósito |
| <i>E. coli</i> TF12Xy170 | NRRL B-50309 | 28 de julio de 2009 |

[0406] La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente a uno autorizado a ello según determinado por leyes de patente extranjera.

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

El depósito está disponible según sea necesario por leyes de patente extranjera en países donde duplicados de la aplicación en cuestión o su descendencia son solicitados.

Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en la derogación de derecho resultante de las patentes concedida por acción gubernamental.

Listado de secuencias

[0407]

<110> Novozymes, Inc. Novozymes A/S Vlasenko, Elena McBrayer, Brett Skovlund, Dominique A Landvik, Sara <120> polipéptidos con actividad de xilanasa y polinucleótidos que los codifican

<130> 11612-WO-PCT
 <150> US 61/259,006
 <151> 2009-11-06
 <160> 21
 <170> versión de PatentIn 3.5

5

<210> 1
 <211> 1197
 <212> ADN
 <213> Trichophaea saccata

10

<400> 1
 atgcgtacct tctcgtctct tctcgggtgtt gcccttctct tgggtgcagc taatgcccag 60
 gtcgcggttt ggggacagtg tgggtggcatt ggttactctg gctcgcacaac ctgcgctgcg 120
 ggaacgactt gtgttaagct gaacgactac tactcccaat gccaacccgg cggtaccact 180
 ttgacaacca ccaccaaacc cgccaccact accactacca ccacggcaac ttctccctca 240
 tcttctcccg gattaaatgc cctggcacia aagagcggcc ggtacttcgg tagtgcaact 300
 gacaaccag agctctccga tgcggcatac attgccatcc tgagcaaca aaacgagttt 360
 gggatcatca cgcctggaaa ctcgatgaaa tgggatgcta ctgaaccgtc ccgcgggagt 420
 ttctcgttca ctggtggaca gcaaattgtt gattttgctc agggcaatgg gcaggctatc 480
 agaggccata ctcttgtctg gtactcccag ttgccgtcct gggttactag cggaaacttc 540
 gataaagcta cattgacatc gatcatgcaa aatcacatta caactcttgt cagccactgg 600
 aagggccagc tcgcctactg ggatgttgtc aacgaagcat tcaacgatga tggcactttc 660
 cgtcaaacg tgttctacac aaccattgga gaggactaca tccagctcgc cttcgaagcc 720
 gcccggtccg ccgaccgcac cgcaaagctc tgcatcaacg actacaacat cgagggcact 780
 ggagccaagt caacagccat gtacaatctc gtctcgaagc tgaatccgc cggcgttccc 840
 atcgactgta ttggtgttca gggacacctc atcgctcggg aagttcccac caccatccaa 900
 gcaaaccttg ccagtttgc gtctttgggt gtggatgtcg cgatcacgga gctagatata 960
 agaatgacgc tgccatctac gactgcattg ctccagcagc aggctaagga ttacgtctcg 1020
 gttgttacag cctgcatgaa tgttcccagg tgtatcggta tcaccatctg ggactacact 1080
 gataaatact cttgggtgcc acaaacctc agcggccagg gcgatgcttg cccatgggat 1140

15

<210> 2
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> Trichophaea saccata

20

<400> 2

ES 2 574 054 T3

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

Ala Asn Ala Gln Val Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr
20 25 30

Ser Gly Ser Thr Thr Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu Asn
35 40 45

Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Gly Thr Thr Leu Thr Thr Thr
50 55 60

Thr Lys Pro Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Thr Ser Pro Ser
65 70 75 80

Ser Ser Pro Gly Leu Asn Ala Leu Ala Gln Lys Ser Gly Arg Tyr Phe
85 90 95

Gly Ser Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp Ala Ala Tyr Ile Ala
100 105 110

Ile Leu Ser Asn Lys Asn Glu Phe Gly Ile Ile Thr Pro Gly Asn Ser
115 120 125

Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Arg Gly Ser Phe Ser Phe Thr
130 135 140

Gly Gly Gln Gln Ile Val Asp Phe Ala Gln Gly Asn Gly Gln Ala Ile
145 150 155 160

Arg Gly His Thr Leu Val Trp Tyr Ser Gln Leu Pro Ser Trp Val Thr
165 170 175

Ser Gly Asn Phe Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Ile Met Gln Asn His
180 185 190

Ile Thr Thr Leu Val Ser His Trp Lys Gly Gln Leu Ala Tyr Trp Asp
195 200 205

Val Val Asn Glu Ala Phe Asn Asp Asp Gly Thr Phe Arg Gln Asn Val
210 215 220

ES 2 574 054 T3

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

Ala Asn Ala Gln Val Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr
 20 25 30

Ser Gly Ser Thr Thr Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu Asn
 35 40 45

Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Gly Thr Thr Leu Thr Thr Thr
 50 55 60

Thr Lys Pro Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Thr Ser Pro Ser
 65 70 75 80

Ser Ser Pro Gly Leu Asn Ala Leu Ala Gln Lys Ser Gly Arg Tyr Phe
 85 90 95

Gly Ser Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp Ala Ala Tyr Ile Ala
 100 105 110

Ile Leu Ser Asn Lys Asn Glu Phe Gly Ile Ile Thr Pro Gly Asn Ser
 115 120 125

Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Arg Gly Ser Phe Ser Phe Thr
 130 135 140

Gly Gly Gln Gln Ile Val Asp Phe Ala Gln Gly Asn Gly Gln Ala Ile
 145 150 155 160

Arg Gly His Thr Leu Val Trp Tyr Ser Gln Leu Pro Ser Trp Val Thr
 165 170 175

Ser Gly Asn Phe Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Ile Met Gln Asn His
 180 185 190

Ile Thr Thr Leu Val Ser His Trp Lys Gly Gln Leu Ala Tyr Trp Asp
 195 200 205

Val Val Asn Glu Ala Phe Asn Asp Asp Gly Thr Phe Arg Gln Asn Val
 210 215 220

<210> 3
 <211> 19
 <212> ADN

| | | |
|----|-----------------------------|----|
| | <213> Trichophaea saccata | |
| | <400> 3 | |
| 5 | Tgctactga de tgaaatggga | 19 |
| | <210> 4 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| 10 | <213> Trichophaea saccata | |
| | <400> 4 | |
| | Caacgactac aacatcgagg | 20 |
| | <210> 5 | |
| 15 | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Trichophaea saccata | |
| | <400> 5 | |
| 20 | Atttgctgtc caccagtgaa | 20 |
| | <210> 6 | |
| | <211> 1599 | |
| | <212> ADN | |
| 25 | <213> Aspergillus fumigatus | |
| | <400> 6 | |

ES 2 574 054 T3

atgctggcct ccaccttctc ctaccgcatg tacaagaccg cgctcatcct ggccgcccctt 60
 ctgggctctg gccaggctca gcaggtcggt acttcccagg cggaagtgca tccgtccatg 120
 acctggcaga gctgcacggc tggcggcagc tgcaccacca acaacggcaa ggtggtcatc 180
 gacgcgaact ggcgttgggt gcacaaagtc ggcgactaca ccaactgcta caccggcaac 240
 acctgggaca cgactatctg ccctgacgat gcgacctgcg catccaactg cgcccttgag 300
 ggtgccaaact acgaatccac ctatggtgtg accgccagcg gcaattccct ccgcctcaac 360
 ttcgtcacca ccagccagca gaagaacatt ggctcgcgctc tgtacatgat gaaggacgac 420
 tcgacctagc agatgtttaa gctgctgaac caggagtcca ccttcgatgt cgatgtctcc 480
 aacctcccct gcggtctcaa cggtgctctg tactttgtcg ccatggacgc cgaccggtggc 540
 atgtccaagt acccaaccaa caaggccggt gccaaagtacg gtactggata ctgtgactcg 600
 cagtgccctc gcgacctcaa gttcatcaac ggtcaggcca acgtcgaagg gtggcagccc 660
 tcctccaacg atgccaatgc gggtaaccggc aaccacgggt cctgctgcmc ggagatggat 720
 atctgggagg ccaacagcat ctccacggcc ttcaccccc atccgtgcmga cacgcccggc 780
 caggatgatg gcaccggtga tgcctgcggt ggcacctaca gctccgaccg ctaccggcggc 840
 acctgcgacc ccgacggatg tgatttcaac tccttccgcc agggcaacaa gaccttctac 900
 ggccctggca tgaccgtcmga caccaagagc aagtttaccg tcgtcaccma gttcatcacc 960
 gacgacggca cctccagcmg cacccctcaag gagatcaagc gcttctacgt gcagaacggc 1020
 aaggatgatcc ccaactcmga gtcmgacctg accggcmgtca gcmggcaactc catcaccacc 1080
 gagtactmga ccmcccagaa gagcctgttc caggaccmga acgtcttcmga aaagcacggc 1140
 ggcctcmgag gcatgggtgc tgcctcmgcc cagggtatgg ttctcmgcat gtccctgtgg 1200
 gatgatcact cmgccaacat gctctggctc gacagcaact acccmgaccac tgcctcttcc 1260
 accactcccg cmgtcmcccg tggtaacctgc gacatctcct ccmgcmgtccc tcmggatgtc 1320
 gagmcmgaacc acccmgacgc ctacmgtcmg tactccaaca tcaagmcmg ccccatcmgcm 1380
 tcmgacctta acagcmggtg ctcmgaacccc ggtmcmgcmga ccaccacmga aactaccacc 1440
 cmgcctacta ccaccacmga cacmgtcmga aacctmggcm gcmccmgtgcm cmgacacmga 1500
 tatmcmccagm gtmgtmgaat cmgatmgaacc gmaccacaa cctmgtmcmga ccttataacc 1560

<210> 7

<211> 532

5 <212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 7

ES 2 574 054 T3

Met Leu Ala Ser Thr Phe Ser Tyr Arg Met Tyr Lys Thr Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gln Ala Gln Gln Val Gly Thr Ser
20 25 30

Gln Ala Glu Val His Pro Ser Met Thr Trp Gln Ser Cys Thr Ala Gly
35 40 45

Gly Ser Cys Thr Thr Asn Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp
50 55 60

Arg Trp Val His Lys Val Gly Asp Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn
65 70 75 80

Thr Trp Asp Thr Thr Ile Cys Pro Asp Asp Ala Thr Cys Ala Ser Asn
85 90 95

Cys Ala Leu Glu Gly Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Tyr Gly Val Thr Ala
100 105 110

Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Thr Ser Gln Gln Lys
115 120 125

Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Met Met Lys Asp Asp Ser Thr Tyr Glu
130 135 140

Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser
145 150 155 160

Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp
165 170 175

Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys
180 185 190

Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe
195 200 205

Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp
210 215 220

ES 2 574 054 T3

Ala Asn Ala Gly Thr Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp
 225 230 235 240

Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala Phe Thr Pro His Pro Cys
 245 250 255

Asp Thr Pro Gly Gln Val Met Cys Thr Gly Asp Ala Cys Gly Gly Thr
 260 265 270

Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp
 275 280 285

Phe Asn Ser Phe Arg Gln Gly Asn Lys Thr Phe Tyr Gly Pro Gly Met
 290 295 300

Thr Val Asp Thr Lys Ser Lys Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr
 305 310 315 320

Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Thr Leu Lys Glu Ile Lys Arg Phe Tyr
 325 330 335

Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Asn Ser Glu Ser Thr Trp Thr Gly
 340 345 350

Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ser
 355 360 365

Leu Phe Gln Asp Gln Asn Val Phe Glu Lys His Gly Gly Leu Glu Gly
 370 375 380

Met Gly Ala Ala Leu Ala Gln Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp
 385 390 395 400

Asp Asp His Ser Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Asn Tyr Pro Thr
 405 410 415

Thr Ala Ser Ser Thr Thr Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Asp Ile
 420 425 430

Ser Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ala Asn His Pro Asp Ala Tyr
 435 440 445

Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro Ile Gly Ser Thr Phe Asn
 450 455 460

Ser Gly Gly Ser Asn Pro Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 465 470 475 480

ES 2 574 054 T3

Gln Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly Asn Pro Gly Gly Thr Gly
 485 490 495

Val Ala Gln His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro
 500 505 510

Thr Thr Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr
 515 520 525

Ser Gln Cys Leu
 530

5 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

10 <400> 8
 Gggcatgctg gcctccacct tctcc 25

15 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

20 <400> 9
 Ctgagagtaa de actacaggca de gggtaatta 30

25 <210> 10
 <211> 1802
 <212> ADN
 <213> Myceliophthora thermophila

<400> 10

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atggccaaga agcttttcat caccgccgcg cttgcggctg ccgtggtggc ggcccccgtc | 60 |
| attgaggagc gccagaactg cggcgctgtg tggtaagaaa gcccggtccg agtctcccat | 120 |
| gattttctcg tcgagtaatg gcataagggc cacccttcg actgaccgtg agaatcgatc | 180 |
| aatccagga ctcaatgctg cggtaacggg tggcaaggtc ccacatgctg cgcctcgggc | 240 |
| tcgacctgcg ttgcgcagaa cgagtgttac tctcagtgcc tgcccaacag ccaggtgacg | 300 |
| agttccacca ctccgctgct gacttccacc tcgcagcgca gcaccagcac ctccagcagc | 360 |
| accaccagga gcggcagctc ctctctctcc tccaccacgc ccccgcccgt ctccagcccc | 420 |
| gtgaccagca ttcccgggcg tgcgacctcc acggcgagct actctggcaa ccccttctcg | 480 |
| ggcgtccggc tcttcgcaa cgactactac aggtccgagg tccacaatct cgccattcct | 540 |
| agcatgactg gtactctggc ggccaaggct tccgcgctcg ccgaagtccc tagcttccag | 600 |
| tggctcgacc ggaacgtcac catcgacacc ctgatggtcc agactctgtc ccaggtccgg | 660 |
| gctctcaata aggcgggtgc caatcctccc tatgctggtg agttacatgg cgacttgctt | 720 |
| tctcgtcccc tacctttctt gacgggatcg gttacctgac ctggaggcaa aacaacaaca | 780 |

ES 2 574 054 T3

```

gccaactcg tcgtctacga cctccccgac cgtgactgtg ccgccgctgc gtccaacggc      840
gagttttcga ttgcaaacgg cggcgccgcc aactacagga gctacatcga cgctatccgc      900
aagcacatca ttgagtactc ggacatccgg atcatcctgg ttatcgagcc cgactcgatg      960
gccaacatgg tgaccaacat gaacgtggcc aagtgcagca acgccgctc gacgtaccac     1020
gagttgaccg tgtacgcgct caagcagctg aacctgceca acgtcgccat gtatctcgac     1080
gccggccacg ccggtgggct cggctggccc gccaacatcc agcccgccgc cgagctgttt     1140
gccggcatct acaatgatgc cggcaagccg gctgcctgcc gcggcctggc cactaacgtc     1200
gccaactaca acgcctggag catcgcttcg gccccgtcgt acacgtcgcc taaccctaac     1260
tacgacgaga agcactacat cgaggccttc agcccgtctt tgaactcggc cggtttcccc     1320
gcacgcttca ttgtcgacac tggccgcaac ggcaaacaac ctaccggtat gttttttttt     1380
cttttgtctc tgtccccccc ttttctcccc cttcagttgg cgtccacaag gtctcttagt     1440
cctgcttcat ctgtgaccaa cctccccccc cccggcaccg cccacaaccg tttgactcta     1500
tactcttggg aatgggcgcc gaaactgacc gttccacagg ccaacaacag tggggtgact     1560
ggtgcaatgt caagggcacc ggctttggcg tgcgcccgac ggccaacacg ggccacgagc     1620
tggtcgatgc ctttgtctgg gtcaagcccg gcggcgagtc cgacggcaca agcgacacca     1680
gcgccgcccg ctacgactac cactgcggcc tgtccgatgc cctgcagcct gccccgagg     1740
ctggacagtg gttccaggcc tacttcgagc agctgctcac caacgccaac ccgccttct     1800
aa                                                                                   1802

```

5 <210> 11
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila

10 <400> 11

```

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

Ala Ala Pro Val Ile Glu Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ala Val Trp Thr
                20           25           30

Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Gln Gly Pro Thr Cys Cys Ala Ser Gly
          35           40           45

Ser Thr Cys Val Ala Gln Asn Glu Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Asn
          50           55           60

Ser Gln Val Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Ser Thr Ser Thr Ser Gln
65           70           75           80

```

ES 2 574 054 T3

Arg Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Thr Thr Arg Ser Gly Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Ser Thr Thr Pro Pro Pro Val Ser Ser Pro Val Thr Ser Ile
 100 105 110
 Pro Gly Gly Ala Thr Ser Thr Ala Ser Tyr Ser Gly Asn Pro Phe Ser
 115 120 125
 Gly Val Arg Leu Phe Ala Asn Asp Tyr Tyr Arg Ser Glu Val His Asn
 130 135 140
 Leu Ala Ile Pro Ser Met Thr Gly Thr Leu Ala Ala Lys Ala Ser Ala
 145 150 155 160
 Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Gln Trp Leu Asp Arg Asn Val Thr Ile
 165 170 175
 Asp Thr Leu Met Val Gln Thr Leu Ser Gln Val Arg Ala Leu Asn Lys
 180 185 190
 Ala Gly Ala Asn Pro Pro Tyr Ala Ala Gln Leu Val Val Tyr Asp Leu
 195 200 205
 Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Ala Ala Ser Asn Gly Glu Phe Ser Ile
 210 215 220
 Ala Asn Gly Gly Ala Ala Asn Tyr Arg Ser Tyr Ile Asp Ala Ile Arg
 225 230 235 240
 Lys His Ile Ile Glu Tyr Ser Asp Ile Arg Ile Ile Leu Val Ile Glu
 245 250 255
 Pro Asp Ser Met Ala Asn Met Val Thr Asn Met Asn Val Ala Lys Cys
 260 265 270
 Ser Asn Ala Ala Ser Thr Tyr His Glu Leu Thr Val Tyr Ala Leu Lys
 275 280 285
 Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp Ala Gly His Ala
 290 295 300
 Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Ile Gln Pro Ala Ala Glu Leu Phe
 305 310 315 320
 Ala Gly Ile Tyr Asn Asp Ala Gly Lys Pro Ala Ala Val Arg Gly Leu
 325 330 335
 Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Trp Ser Ile Ala Ser Ala Pro

ES 2 574 054 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Ser | Tyr | Thr | Ser | Pro | Asn | Pro | Asn | Tyr | Asp | Glu | Lys | His | Tyr | Ile | Glu |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Ala | Phe | Ser | Pro | Leu | Leu | Asn | Ser | Ala | Gly | Phe | Pro | Ala | Arg | Phe | Ile |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Val | Asp | Thr | Gly | Arg | Asn | Gly | Lys | Gln | Pro | Thr | Gly | Gln | Gln | Gln | Trp |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Gly | Asp | Trp | Cys | Asn | Val | Lys | Gly | Thr | Gly | Phe | Gly | Val | Arg | Pro | Thr |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Ala | Asn | Thr | Gly | His | Glu | Leu | Val | Asp | Ala | Phe | Val | Trp | Val | Lys | Pro |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Gly | Gly | Glu | Ser | Asp | Gly | Thr | Ser | Asp | Thr | Ser | Ala | Ala | Arg | Tyr | Asp |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| Tyr | His | Cys | Gly | Leu | Ser | Asp | Ala | Leu | Gln | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Gly |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| Gln | Trp | Phe | Gln | Ala | Tyr | Phe | Glu | Gln | Leu | Leu | Thr | Asn | Ala | Asn | Pro |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |

Pro

- <210> 12
- <211> 1849
- <212> ADN
- <213> Trichoderma reesei

5

<400> 12

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| tgccatttct | gacctggata | ggttttccta | tggtcattcc | tataagagac | acgctctttc | 60 |
| gtcggcccgt | agatatcaga | ttggtattca | gtcgcacaga | cgaaggtgag | ttgatcctcc | 120 |
| aacatgagtt | ctatgagccc | cccccttgcc | cccccccgtt | caccttgacc | tgcaatgaga | 180 |
| atcccacctt | ttacaagagc | atcaagaagt | attaatggcg | ctgaatagcc | tctgctcgat | 240 |
| aatatctccc | cgatcatgac | aatgaacaag | tccgtggctc | cattgctgct | tgcagcgtcc | 300 |
| atactatatg | gcgggcccgt | cgcacagcag | actgtctggg | gccagtgtgg | aggtattggt | 360 |
| tggagcggac | ctacgaattg | tgctcctggc | tcagcttggt | cgaccctcaa | tccttattat | 420 |
| gcgcaatgta | ttccgggagc | cactactatc | accacttcga | cccggccacc | atccggtcca | 480 |
| accaccacca | ccagggctac | ctcaacaagc | tcatcaactc | caccacgag | ctctggggtc | 540 |
| cgatttgccg | gcgttaacat | cgcggtttt | gactttggct | gtaccacaga | gtgagtaccc | 600 |

ES 2 574 054 T3

ttgtttcctg gtgttgctgg ctggttgggc gggatacag cgaagcggac gcaagaacac 660
 cgccgggccg ccaccatcaa gatgtgggtg gtaagcggcg gtgttttgta caactacctg 720
 acagctcact caggaaatga gaattaatgg aagtcttggt acagtggcac ttgcggtacc 780
 tcgaagggtt atcctcogtt gaagaacttc accggctcaa acaactaccc cgatggcatc 840
 ggccagatgc agcacttctg caacgaggac gggatgacta ttttccgctt acctgtcgga 900
 tggcagtacc tcgtcaacaa caatttgggc ggcaatcttg attccacgag catttccaag 960
 tatgatcagc ttgttcaggg gtgcctgtct ctgggcgcat actgcatcgt cgacatccac 1020
 aattatgctc gatggaacgg tgggatcatt ggtcagggcg gccctactaa tgctcaattc 1080
 acgagccttt ggtcgcagtt ggcacaaag tacgcatctc agtcgagggt gtggttcggc 1140
 atcatgaatg agccccacga cgtgaacatc aacacctggg ctgccacggt ccaagagggt 1200
 gtaaccgcaa tccgcaacgc tggtgctacg tcgcaattca tctctttgcc tggaaatgat 1260
 tggcaatctg ctggggcttt catatccgat ggcagtgcag ccgccctgtc tcaagtccag 1320
 aaccgggatg ggtcaacaac gaatctgatt tttgacgtgc acaaatactt ggactcagac 1380
 aactccggtc ctcacgccga atgtactaca aataacattg acggcgcctt ttctccgctt 1440
 gccacttggc tccgacagaa caatcgccag gctatcctga cagaaaccgg tgggtggcaac 1500
 gttcagtcct gcatacaaga catgtgccag caaatccaat atctcaacca gaactcagat 1560
 gtctatcttg gctatgttgg ttgggggtgcc ggatcatttg atagcacgta tgtcctgacg 1620
 gaaacaccga ctggcagtggt taactcatgg acggacacat ccttggtcag ctctgtctc 1680
 gcaagaaagt agcactctga gctgaatgca gaagcctcgc caacgtttgt atctcgctat 1740
 caaacatagt agctactcta tgaggctgtc tgttctcgat ttcagcttta tatagtttca 1800
 tcaaacagta catattcoct ctgtggccac gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1849

<210> 13

<211> 418

5 <212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<400> 13

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Val Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
 20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
 35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
 50 55 60

ES 2 574 054 T3

Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
 65 70 75 80
 Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala
 85 90 95
 Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr
 100 105 110
 Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser
 115 120 125
 Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Glu
 130 135 140
 Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
 145 150 155 160
 Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr
 165 170 175
 Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val
 180 185 190
 Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
 195 200 205
 Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
 210 215 220
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro
 225 230 235 240
 His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
 245 250 255
 Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
 260 265 270
 Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
 275 280 285
 Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
 290 295 300
 Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
 305 310 315 320

ES 2 574 054 T3

Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala
325 330 335

Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln
355 360 365

Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 14

<211> 1188

5 <212> ADN

<213> Myceliophthora thermophila

<400> 14

ES 2 574 054 T3

cgacttgaaa cgccccaaat gaagtcctcc atcctcgcca gcgtcttcgc cacgggcgcc 60
 gtggctcaaa gtggctcgtg gcagcaatgt ggtggcatcg gatggcaagg atcgaccgac 120
 tgtgtgtcgg gctaccactg cgtctaccag aacgattggt acagccagtg cgtgcctggc 180
 gcggcgctga caacgctgca gacatcgacc acgtccaggg ccaccgccac cagcaccgcc 240
 cctccgtcgt ccaccacctc gcctagcaag ggcaagctga agtggctcgg cagcaacgag 300
 tcgggcgccg agttcgggga gggcaattac cccggcctct ggggcaagca ctatcatctc 360
 ccgtcgactt cggcgattca gacgctcatc aatgatggat acaacatctt ccggatcgac 420
 ttctcgatgg agcgtctggt gcccaaccag ttgacgtcgt ccttcgacca gggttacctc 480
 cgcaacctga ccgaggtggt caacttcgtg acgaacggcg gcaagtacgc cgtcctggac 540
 ccgcacaact acggccggta ctacggcaac atcatcacgg acacgaacgc gttccggacc 600
 ttctggacca acctggccaa gcagttcggc tccaactcgc tcgtcatctt cgacaccaac 660
 aacgagtaca acacgatgga ccagaccctg gtgctcaacc tcaaccaggc cgccatcgac 720
 ggcatccggg ccgccggcgc gacctcgcag tacatcttcg tcgagggcaa cgcgtggagc 780
 ggggcctgga gctggaacac gaccaacacc aacatggccg ccctgacgga cccgcagaac 840
 aagatcgtgt acgagatgca ccagtacctc gactcggaca gctcggggcac ccacgccgag 900
 tgctcagca gcaccatcgg cgcccagcgc gtcgtcggag ccaccctcgt gctccgcgcc 960
 aacggcaagc tcggcgtcct cggcgagttc gccggcggcg ccaacgccgt ctgccagcag 1020
 gccgtcaccg gcctcctcga ccacctccag gacaacagcg acgtctggct gggtgccctc 1080
 tggtagggccg ccggtccctg gtggggcgac tacatgtact cgttcgagcc tccttcgggc 1140
 accggctatg tcaactacaa ctcgatcttg aagaagtact tgccgtaa 1188

5 <210> 15
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila

10 <400> 15

ES 2 574 054 T3

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

Gln Ser Gly Pro Trp Gln Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Gln Gly Ser
 20 25 30

Thr Asp Cys Val Ser Gly Tyr His Cys Val Tyr Gln Asn Asp Trp Tyr
 35 40 45

Ser Gln Cys Val Pro Gly Ala Ala Ser Thr Thr Leu Gln Thr Ser Thr
 50 55 60

Thr Ser Arg Pro Thr Ala Thr Ser Thr Ala Pro Pro Ser Ser Thr Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Ser Lys Gly Lys Leu Lys Trp Leu Gly Ser Asn Glu Ser Gly
 85 90 95

Ala Glu Phe Gly Glu Gly Asn Tyr Pro Gly Leu Trp Gly Lys His Phe
 100 105 110

Ile Phe Pro Ser Thr Ser Ala Ile Gln Thr Leu Ile Asn Asp Gly Tyr
 115 120 125

Asn Ile Phe Arg Ile Asp Phe Ser Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Gln
 130 135 140

Leu Thr Ser Ser Phe Asp Gln Gly Tyr Leu Arg Asn Leu Thr Glu Val
 145 150 155 160

Val Asn Phe Val Thr Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Val Leu Asp Pro His
 165 170 175

Asn Tyr Gly Arg Tyr Tyr Gly Asn Ile Ile Thr Asp Thr Asn Ala Phe
 180 185 190

ES 2 574 054 T3

Arg Thr Phe Trp Thr Asn Leu Ala Lys Gln Phe Ala Ser Asn Ser Leu
 195 200 205

Val Ile Phe Asp Thr Asn Asn Glu Tyr Asn Thr Met Asp Gln Thr Leu
 210 215 220

Val Leu Asn Leu Asn Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Ala Thr Ser Gln Tyr Ile Phe Val Glu Gly Asn Ala Trp Ser Gly Ala
 245 250 255

Trp Ser Trp Asn Thr Thr Asn Thr Asn Met Ala Ala Leu Thr Asp Pro
 260 265 270

Gln Asn Lys Ile Val Tyr Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Ser
 275 280 285

Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Val Ser Ser Thr Ile Gly Ala Gln Arg
 290 295 300

Val Val Gly Ala Thr Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Leu Gly Val
 305 310 315 320

Leu Gly Glu Phe Ala Gly Gly Ala Asn Ala Val Cys Gln Gln Ala Val
 325 330 335

Thr Gly Leu Leu Asp His Leu Gln Asp Asn Ser Asp Val Trp Leu Gly
 340 345 350

Ala Leu Trp Trp Ala Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Met Tyr Ser
 355 360 365

Phe Glu Pro Pro Ser Gly Thr Gly Tyr Val Asn Tyr Asn Ser Ile Leu
 370 375 380

Lys Lys Tyr Leu Pro
 385

<210> 16

<211> 799

<212> ADN

<213> Thermoascus aurantiacus

5

<400> 16

ES 2 574 054 T3

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

5 <210> 17
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Thermoascus aurantiacus

10 <400> 17

ES 2 574 054 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 681

<212> ADN

<213> Thielavia terrestris

5

ES 2 574 054 T3

<400> 18

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atgctcgcaa acggtgccat cgtcttctg gccgccgcc tcggcgctcag tggccactac | 60 |
| acctggccac gggttaacga cggcgccgac tggcaacagg tccgtaaggc ggacaactgg | 120 |
| caggacaacg gctacgtcgg ggatgtcacg tcgccacaga tccgctgttt ccaggcgacc | 180 |
| ccgtccccgg ccccatccgt cctcaacacc acggccggct cgaccgtgac ctactgggcc | 240 |
| aacccccgacg tctaccaccc cgggcctgtg cagttttaca tggcccgcgt gcccgatggc | 300 |
| gaggacatca actcgtggaa cggcgacggc gccgtgtggt tcaaggtgta cgaggaccat | 360 |
| cctacctttg gcgctcagct cacatggccc agcacgggca agagctcgtt cgcggtccc | 420 |
| atccccccgt gcatcaagtc cggctactac ctctccggg cggagcaaat cggcctgcac | 480 |
| gtcgcccaga gcgtaggcgg agcgcagttc tacatctcat gcgcccagct cagcgtcacc | 540 |
| ggcggcggca gcaccgagcc gccgaacaag gtggccttcc ccggcgctta cagtgcgacg | 600 |
| gaccggggca ttctgatcaa catctactac cctgttccca cgtcctacca gaacccccggc | 660 |
| ccggccgtct tcagctgctg a | 681 |

- 5 <210> 19
- <211> 226
- <212> PRT
- <213> Thielavia terrestris

10 <400> 19

ES 2 574 054 T3

Met Leu Ala Asn Gly Ala Ile Val Phe Leu Ala Ala Ala Leu Gly Val
 1 5 10 15

Ser Gly His Tyr Thr Trp Pro Arg Val Asn Asp Gly Ala Asp Trp Gln
 20 25 30

Gln Val Arg Lys Ala Asp Asn Trp Gln Asp Asn Gly Tyr Val Gly Asp
 35 40 45

Val Thr Ser Pro Gln Ile Arg Cys Phe Gln Ala Thr Pro Ser Pro Ala
 50 55 60

Pro Ser Val Leu Asn Thr Thr Ala Gly Ser Thr Val Thr Tyr Trp Ala
 65 70 75 80

Asn Pro Asp Val Tyr His Pro Gly Pro Val Gln Phe Tyr Met Ala Arg
 85 90 95

Val Pro Asp Gly Glu Asp Ile Asn Ser Trp Asn Gly Asp Gly Ala Val
 100 105 110

Trp Phe Lys Val Tyr Glu Asp His Pro Thr Phe Gly Ala Gln Leu Thr
 115 120 125

Trp Pro Ser Thr Gly Lys Ser Ser Phe Ala Val Pro Ile Pro Pro Cys
 130 135 140

Ile Lys Ser Gly Tyr Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Gln Ile Gly Leu His
 145 150 155 160

Val Ala Gln Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln
 165 170 175

Leu Ser Val Thr Gly Gly Gly Ser Thr Glu Pro Pro Asn Lys Val Ala
 180 185 190

Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile
 195 200 205

Tyr Tyr Pro Val Pro Thr Ser Tyr Gln Asn Pro Gly Pro Ala Val Phe
 210 215 220

Ser Cys
 225

- <210> 20
- <211> 2800
- <212> ADN
- <213> Penicillium brasilianum

ES 2 574 054 T3

<400> 20

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tgaaaatgca gggttctaca atctttctgg ctttcgcctc atgggcgagc caggttgcctg | 60 |
| ccattgcgca gccatacag aagcacgagg tttgttttat cttgctcatg gacgtgcttt | 120 |
| gacttgacta attgttttac atacagcccc gatttctgca cgggccccaa gccatagaat | 180 |
| cgttctcaga accgttctac ccgtcgcctt ggatgaatcc tcacgccgag ggctgggagg | 240 |
| ccgcatatca gaaagctcaa gattttgtct cgcaactcac tatcttgag aaaataaatc | 300 |
| tgaccaccgg tgttgggtaa gtctctccga ctgcttctgg gtcacgggtgc gacgagccac | 360 |
| tgactttttg aagctgggaa aatgggccgt gtgtaggaaa cactggatca attcctcgtc | 420 |
| tcggattcaa aggattttgt acccaggatt caccacaggg tgttcggttc gcagattatt | 480 |
| cctccgcttt cacatctagc caaatggccg ccgcaacatt tgaccgctca attctttatc | 540 |
| aacgaggcca agccatggca caggaacaca aggctaaggg tatcacaatt caattgggcc | 600 |
| ctggtgccgg ccctctcggc cgcacccccg agggcggccg caactgggaa ggattctccc | 660 |
| ctgatcctgt cttgactggt atagccatgg ctgagacaat taaggcatg caggatactg | 720 |
| gagtgattgc ttgcgctaaa cattatattg gaaacgagca ggagcacttc cgtcaagtgg | 780 |
| gtgaagctgc gggtcacgga tacactatct ccgatactat ttcactaat attgacgacc | 840 |
| gtgctatgca tgagctatac ttgtggccat ttgctgatgc cgttcgcgct ggtgtgggtt | 900 |
| ctttcatgtg ctcatactct cagatcaaca actcctacgg atgccaaaac agtcagacct | 960 |
| tcaacaagct cctcaagagc gaattgggct tccaaggctt tgtcatgagc gattgggggtg | 1020 |
| cccatcactc tggagtgtca tcggcgctag ctggacttga tatgagcatg ccgggtgata | 1080 |
| ccgaatttga ttctggcttg agcttctggg gctctaacct caccattgca attctgaacg | 1140 |
| gcacgggtcc cgaatggcgc ctggatgaca tggcgatgcg aattatggct gcatacttca | 1200 |
| aagttggcct tactattgag gatcaaccag atgtcaactt caatgcctgg acctatgaca | 1260 |
| cctacggata taaatacgtt tatagcaagg aagattacga gcaggtcaac tggcatgtcg | 1320 |
| atgttcgcag cgaccacaat aagctcattc gcgagactgc cgcgaagggt acagttctgc | 1380 |
| tgaagaacaa ctttcatgct ctccctctga agcagcccag gttcgtggcc gtcgttggtc | 1440 |
| aggatgccgg gccaaacccc aagggcccta acggctgctc agaccgagga tgcgaccaag | 1500 |
| gcactctcgc aatgggatgg ggctcagggc ctaccgaatt cccttacctg gtcactcctg | 1560 |
| acactgctat tcagtcaaag gtccctcgaat acgggggtcg atacgagagt atttttgata | 1620 |
| actatgacga caatgctatc ttgtcgcttg tctcacagcc tgatgcaacc tgtatcgttt | 1680 |
| ttgcaaatgc cgattccggt gaaggctaca tcaactgtca caacaactgg ggtgaccgca | 1740 |
| acaatctgac cctctggcaa aatgccgatc aagtgattag cactgtcagc tcgcatgca | 1800 |
| acaacacaat cgttgttctc cactctgtcg gaccagtgtt gctaaatggg atatatgagc | 1860 |
| accgcaacat cacagctatt gtctgggcag ggatgccagg cgaagaatct ggcaatgctc | 1920 |

ES 2 574 054 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| tcgtggatat | tctttggggc | aatgtaacc | ctgccggtcg | cactccgttc | acctgggcca | 1980 |
| aaagtcgaga | ggactatggc | actgatataa | tgtacgagcc | caacaacggc | cagcgtgcgc | 2040 |
| ctcagcagga | tttcaccgag | agcatctacc | tcgactaccg | ccatttcgac | aaagctggta | 2100 |
| tcgagccaat | ttacgagttt | ggattcggcc | tctcctatac | caccttcgaa | tactctgacc | 2160 |
| tccgtgttgt | gaagaagtat | gttcaacat | acagtcccac | gaccggcacc | ggtgctcaag | 2220 |
| caccttccat | cggacagcca | cctagccaga | acctggatac | ctacaagttc | cctgctacat | 2280 |
| acaagtacat | caaaccttc | atttatccct | acctgaacag | cactgtctcc | ctccgcgctg | 2340 |
| cttccaagga | tcccgaatac | ggtcgtacag | actttatccc | accccacgcg | cgtgatggct | 2400 |
| cccctcaacc | tctcaacccc | gctggagacc | cagtggccag | tggtggaac | aacatgctct | 2460 |
| acgacgaact | ttacgaggtc | actgcacaga | tcaaaaacac | tggcgacgtg | gccggcgacg | 2520 |
| aagtcgtcca | gctttacgta | gatctcgggg | gtgacaacct | gcctcgtcag | ttgagaaact | 2580 |
| ttgacaggtt | ttatctgctg | cccggtcaga | gctcaacatt | ccgggctaca | ttgacgcgcc | 2640 |
| gtgatttgag | caactgggat | attgaggcgc | agaactggcg | agttacggaa | tcgcctaaga | 2700 |
| gagtgtatgt | tggacggtcg | agtcgggatt | tgccgctgag | ctcacaattg | gagtaatgat | 2760 |
| catgtctacc | aatagatggt | gaatgtctgg | tgtggatatt | | | 2800 |

- <210> 21
- 5 <211> 878
- <212> PRT
- <213> *Penicillium brasilianum*
- <400> 21

ES 2 574 054 T3

Met Gln Gly Ser Thr Ile Phe Leu Ala Phe Ala Ser Trp Ala Ser Gln
 1 5 10 15

Val Ala Ala Ile Ala Gln Pro Ile Gln Lys His Glu Pro Gly Phe Leu
 20 25 30

His Gly Pro Gln Ala Ile Glu Ser Phe Ser Glu Pro Phe Tyr Pro Ser
 35 40 45

Pro Trp Met Asn Pro His Ala Glu Gly Trp Glu Ala Ala Tyr Gln Lys
 50 55 60

Ala Gln Asp Phe Val Ser Gln Leu Thr Ile Leu Glu Lys Ile Asn Leu
 65 70 75 80

Thr Thr Gly Val Gly Trp Glu Asn Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Gly
 85 90 95

Ser Ile Pro Arg Leu Gly Phe Lys Gly Phe Cys Thr Gln Asp Ser Pro
 100 105 110

ES 2 574 054 T3

Gln Gly Val Arg Phe Ala Asp Tyr Ser Ser Ala Phe Thr Ser Ser Gln
 115 120 125

Met Ala Ala Ala Thr Phe Asp Arg Ser Ile Leu Tyr Gln Arg Gly Gln
 130 135 140

Ala Met Ala Gln Glu His Lys Ala Lys Gly Ile Thr Ile Gln Leu Gly
 145 150 155 160

Pro Val Ala Gly Pro Leu Gly Arg Ile Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp
 165 170 175

Glu Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Ile Ala Met Ala Glu
 180 185 190

Thr Ile Lys Gly Met Gln Asp Thr Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His
 195 200 205

Tyr Ile Gly Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Val Gly Glu Ala Ala
 210 215 220

Gly His Gly Tyr Thr Ile Ser Asp Thr Ile Ser Ser Asn Ile Asp Asp
 225 230 235 240

Arg Ala Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg
 245 250 255

Ala Gly Val Gly Ser Phe Met Cys Ser Tyr Ser Gln Ile Asn Asn Ser
 260 265 270

Tyr Gly Cys Gln Asn Ser Gln Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ser Glu
 275 280 285

Leu Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Gly Ala His His Ser
 290 295 300

Gly Val Ser Ser Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp
 305 310 315 320

Thr Glu Phe Asp Ser Gly Leu Ser Phe Trp Gly Ser Asn Leu Thr Ile
 325 330 335

Ala Ile Leu Asn Gly Thr Val Pro Glu Trp Arg Leu Asp Asp Met Ala
 340 345 350

Met Arg Ile Met Ala Ala Tyr Phe Lys Val Gly Leu Thr Ile Glu Asp
 355 360 365

ES 2 574 054 T3

Gln Pro Asp Val Asn Phe Asn Ala Trp Thr His Asp Thr Tyr Gly Tyr
 370 375 380

Lys Tyr Ala Tyr Ser Lys Glu Asp Tyr Glu Gln Val Asn Trp His Val
 385 390 395 400

Asp Val Arg Ser Asp His Asn Lys Leu Ile Arg Glu Thr Ala Ala Lys
 405 410 415

Gly Thr Val Leu Leu Lys Asn Asn Phe His Ala Leu Pro Leu Lys Gln
 420 425 430

Pro Arg Phe Val Ala Val Val Gly Gln Asp Ala Gly Pro Asn Pro Lys
 435 440 445

Gly Pro Asn Gly Cys Ala Asp Arg Gly Cys Asp Gln Gly Thr Leu Ala
 450 455 460

Met Gly Trp Gly Ser Gly Ser Thr Glu Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro
 465 470 475 480

Asp Thr Ala Ile Gln Ser Lys Val Leu Glu Tyr Gly Gly Arg Tyr Glu
 485 490 495

Ser Ile Phe Asp Asn Tyr Asp Asp Asn Ala Ile Leu Ser Leu Val Ser
 500 505 510

Gln Pro Asp Ala Thr Cys Ile Val Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu
 515 520 525

Gly Tyr Ile Thr Val Asp Asn Asn Trp Gly Asp Arg Asn Asn Leu Thr
 530 535 540

Leu Trp Gln Asn Ala Asp Gln Val Ile Ser Thr Val Ser Ser Arg Cys
 545 550 555 560

Asn Asn Thr Ile Val Val Leu His Ser Val Gly Pro Val Leu Leu Asn
 565 570 575

Gly Ile Tyr Glu His Pro Asn Ile Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Met
 580 585 590

Pro Gly Glu Glu Ser Gly Asn Ala Leu Val Asp Ile Leu Trp Gly Asn
 595 600 605

Val Asn Pro Ala Gly Arg Thr Pro Phe Thr Trp Ala Lys Ser Arg Glu
 610 615 620

ES 2 574 054 T3

Asp Tyr Gly Thr Asp Ile Met Tyr Glu Pro Asn Asn Gly Gln Arg Ala
 625 630 635 640
 Pro Gln Gln Asp Phe Thr Glu Ser Ile Tyr Leu Asp Tyr Arg His Phe
 645 650 655
 Asp Lys Ala Gly Ile Glu Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser
 660 665 670
 Tyr Thr Thr Phe Glu Tyr Ser Asp Leu Arg Val Val Lys Lys Tyr Val
 675 680 685
 Gln Pro Tyr Ser Pro Thr Thr Gly Thr Gly Ala Gln Ala Pro Ser Ile
 690 695 700
 Gly Gln Pro Pro Ser Gln Asn Leu Asp Thr Tyr Lys Phe Pro Ala Thr
 705 710 715 720
 Tyr Lys Tyr Ile Lys Thr Phe Ile Tyr Pro Tyr Leu Asn Ser Thr Val
 725 730 735
 Ser Leu Arg Ala Ala Ser Lys Asp Pro Glu Tyr Gly Arg Thr Asp Phe
 740 745 750
 Ile Pro Pro His Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Asn Pro Ala
 755 760 765
 Gly Asp Pro Val Ala Ser Gly Gly Asn Asn Met Leu Tyr Asp Glu Leu
 770 775 780
 Tyr Glu Val Thr Ala Gln Ile Lys Asn Thr Gly Asp Val Ala Gly Asp
 785 790 795 800
 Glu Val Val Gln Leu Tyr Val Asp Leu Gly Gly Asp Asn Pro Pro Arg
 805 810 815
 Gln Leu Arg Asn Phe Asp Arg Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Gln Ser Ser
 820 825 830
 Thr Phe Arg Ala Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Ile
 835 840 845
 Glu Ala Gln Asn Trp Arg Val Thr Glu Ser Pro Lys Arg Val Tyr Val
 850 855 860
 Gly Arg Ser Ser Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ser Gln Leu Glu
 865 870 875

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado con actividad de xilanasas, seleccionado del grupo consistente en:
 (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos 65% en identidad al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 65% en identidad al polipéptido maduro que codifica la secuencia de SEC ID n.º: 1; y
 10 (c) una variante que comprende una sustitución, deleción, y/o inserción de 1 - 5 aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2; o un fragmento del mismo con actividad de xilanasas.
- 15 3. Polipéptido según la reivindicación 1, que es codificado por el polinucleótido contenido en pTF12Xyl170 plásmido que se encuentra en *E. coli* NRRL B-50309.
4. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 20 5. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende: (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
- 25 6. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
- 30 7. Método para producir un mutante de una célula madre, que comprende interrupción o borrado de un polinucleótido que codifica el polipéptido, o una porción del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que produce que el mutante produzca menos del polipéptido que la célula madre.
8. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende: (a) cultivo de una planta o una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
- 35 9. Planta, parte de planta o célula vegetal transgénica con el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 40 10. Molécula de ARN inhibitorio bicatenario (ARNds) que comprende una subsecuencia del polinucleótido según la reivindicación 4, donde opcionalmente el ARNds es una molécula ARNsi o ARNm.
- 45 11. Método de inhibición de la expresión de un polipéptido con actividad de xilanasas en una célula, que comprende administración a la célula o expresión en la célula de la molécula de ARN inhibitorio bicatenario según la reivindicación 10.
12. Polinucleótido aislado que codifican un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 19 de la SEC ID n.º: 2.
- 50 13. Método para producir una proteína, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido según la reivindicación 12, donde el gen es extranjero al polinucleótido bajo condiciones propicias para la producción de la proteína; y (b) recuperación de la proteína.
- 55 14. Método para la degradación o la conversión de un material celulósico o material que contiene xilano, que comprende: tratar el material celulósico o material que contiene xilano con una composición enzimática en la presencia del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 60 15. Método según la reivindicación 14, que comprende además recuperación del material celulósico degradado o del material que contiene xilano.
16. Método para la producción de un producto de fermentación, que comprende:
 (a) sacarificación de un material celulósico o material que contiene xilano con una composición enzimática
 65 en presencia del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3;

- (b) fermentar el material celulósico sacarificado o material que contiene xilano sacarificado con uno o más (varios) microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y
- (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

- 5 17. Método de fermentación de un material celulósico o material que contiene xilano, que comprende: fermentar el material celulósico o material que contiene xilano con uno o más (varios) microorganismos fermentadores, donde el material celulósico o material que contiene xilano se sacarifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 10 18. Método según la reivindicación 17, donde la fermentación del material celulósico o material que contiene xilano produce un producto de fermentación.
- 15 19. Método según la reivindicación 18, que comprende además recuperación del producto de fermentación de la fermentación.
- 20. Método según la reivindicación 18 o 19, donde el producto de fermentación es un alcohol, un ácido orgánico, una cetona, un aminoácido, o un gas.

ES 2 574 054 T3

M R T F S S L L G V A L L L G A A N A Q V A V W G
1 ATGCGTACCTTCTCGTCTCTTCTCGGTGTTGCCCTTCTCTGGGTGCAGCTAATGCCAGGTCGCGGTTTGGGGA
Q C G G I G Y S G S T T C A A G T T C V K L N D Y
76 CAGTGTGGTGGCATTGGTTACTCTGGCTCGACAACCTGCGCTGCGGGAACGACTTGTGTTAAGCTGAACGACTAC
Y S Q C Q P G G T T L T T T T K P A T T T T T T T
151 TACTCCCAATGCCAACCCGGCGGTACCCTTTGACAACCACCACCAACCCGCCACCCTACCCTACCACCACG
A T S P S S S P G L N A L A Q K S G R Y F G S A T
226 GCAACTTCTCCCTCATCTTCTCCCGGATTAATGCCCTGGCACAAAAGAGCGGCGGTACTTCCGTTAGTGCAACT
D N P E L S D A A Y I A I L S N K N E F G I I T P
301 GACAACCCAGAGCTCTCCGATGCGGCATACATTGCCATCCTGAGCAACAAAACGAGTTTGGGATCATCAGCCT
G N S M K W D A T E P S R G S F S F T G G Q Q I V
376 GGAAACTCGATGAAATGGGATGCTACTGAACCGTCCCGGGGAGTTTCTCGTTCAGTGGTGGACAGCAAATTGTT
D F A Q G N G Q A I R G H T L V W Y S Q L P S W V
451 GATTTTGGCAGGGCAATGGCAGGCTATCAGAGGCCATACTCTGTCTGGTACTCCAGTTGCCGCTCTGGGTT
T S G N F D K A T L T S I M Q N H I T T L V S H W
526 ACTAGCGGAAACTTCGATAAAGCTACATTGACATCGATCATGCAAAATCACATTACAACCTCTTGTGAGCCACTGG
K G Q L A Y W D V V N E A F N D D G T F R Q N V F
601 AAGGGCCAGCTCGCCTACTGGGATGTTGTCAACGAAGCATTCAACGATGATGGCACTTCCGTCAAACCGTGTT
Y T T I G E D Y I Q L A F E A A R A A D P T A K L
676 TACACAACCATTGGAGAGGACTACATCCAGCTCGCCTTCGAAGCCGCCCGTCCCGCCGACCCGACCGCAAAGCTC
C I N D Y N I E G T G A K S T A M Y N L V S K L K
751 TGCATCAACGACTACAACATCGAGGGCACTGGAGCCAAGTCAACAGCCATGTACAATCTCGTCTCGAAGCTGAAA
S A G V P I D C I G V Q G H L I V G E V P T T I Q
826 TCCGCCGCGTTCATCGACTGTATGGTGTTCAGGGACACCTCATCGTCCGTGAAAGTTCCCAACCATCCAA
A N L A Q F A S L L G V D V A I T E L D I R M T L P
901 GCAAACCTTGCCAGTTTGGCTCTTTGGGTGGATGTCCGATCACGGAGCTAGATATCAGAATGACGCTGCCA
S T T A L L Q Q Q A K D Y V S V V T A C M N V P R
976 TCTACGACTGCATTGCTCCAGCAGCAGGCTAAGGATTACGTCTCGGTTGTTACAGCCTGCATGAATGTTCCAGG
C I G I T I W D Y T D K Y S W V P Q T F S G Q G D
1051 TGTATCGGTATCACCATCTGGGACTACACTGATAAATACTCTTGGGTGCCACAAACCTTCAGCGGCCAGGGCGAT
A C P W D A N L Q K K P A Y S A I A S A L A A *
1126 GCTTGCCCATGGGATGCCAACCTGCAGAAGAAGCCAGCCTACTCCGCTATTGCGTCTGCTCTTGGCGCTTGA

Fig. 1

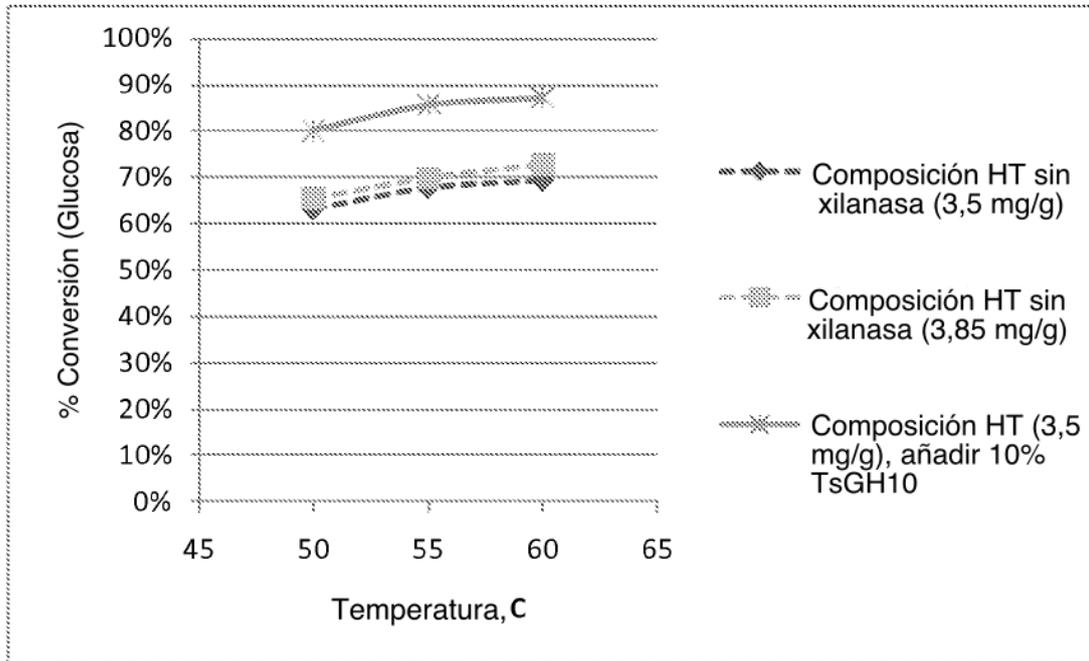


Fig. 2

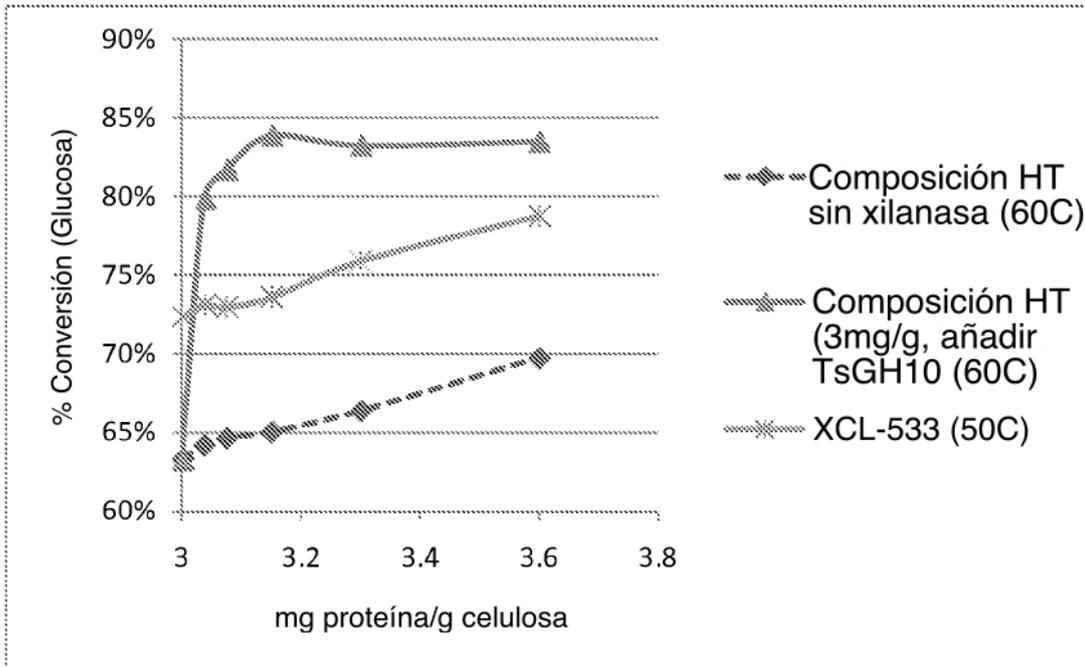


Fig. 3

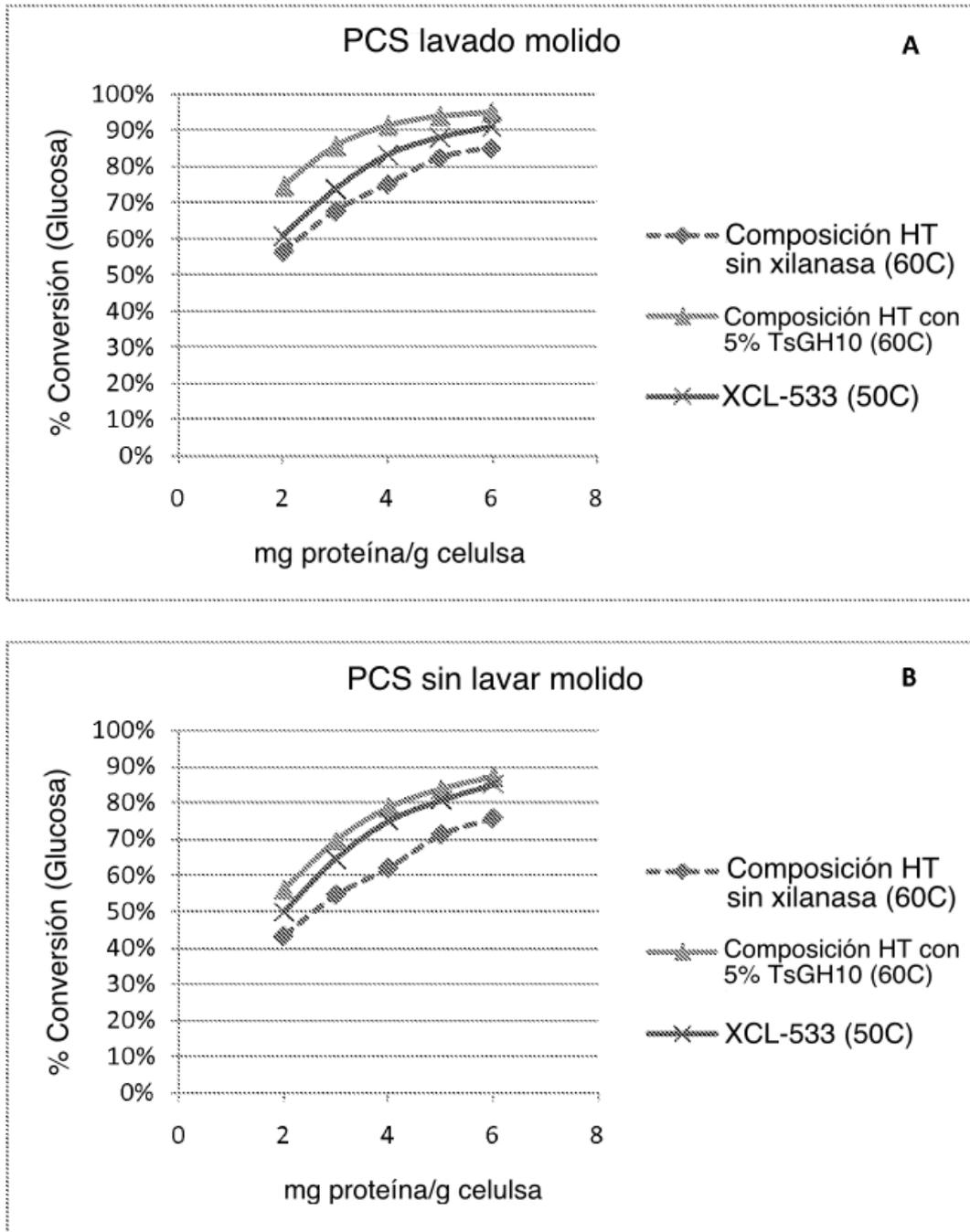


Fig. 4