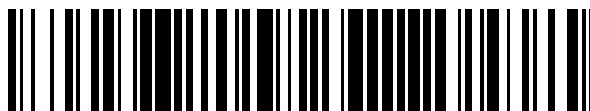


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 307**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2012 E 12748613 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2739727**

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

30 Prioridad:

04.08.2011 EP 11250700

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

13.10.2016

73 Titular/es:

NOVOZYMES, INC. (100.0%)

1445 Drew Avenue

Davis, CA 95616, US

72 Inventor/es:

SPODSBERG, NIKOLAJ

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 586 307 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 xilanasas y polinucleótidos que los codifican

5 Declaración en cuanto a derechos de invenciones hechas con investigación y desarrollo patrocinados con fondos federales

[0001] Esta invención fue hecha en parte con ayuda del gobierno bajo el acuerdo cooperativo DE-FC36-08GO18080 otorgado por el Departamento de Energía.

10 El gobierno tiene ciertos derechos sobre esta invención.

Referencia a un listado de secuencias

[0002] Esta aplicación contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador.

15 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

20 [0003] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de xilanasas 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 para producir y utilizar los polipéptidos.

25 Descripción de las técnicas relacionadas

[0004] La celulosa es un polímero de glucosa enlazada por beta-1,4-enlaces. Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos beta-enlazados. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas.

30 Las endoglucanasas asimilan el polímero de celulosa en ubicaciones al azar, con lo que la abren a ataque por celobiohidrolasas.

Las celobiohidrolasas liberan secuencialmente moléculas de celobiosa de las extremidades del polímero de celulosa.

La celobiosa es un dímero beta-1,4-ligado de glucosa soluble en agua.

Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa a glucosa.

35 [0005] La conversión de materias primas lignocelulósicas en etanol tiene las ventajas de la disponibilidad preparada de cantidades grandes de materia prima, la conveniencia de evitar quemar o verter los materiales, y la limpieza del combustible de etanol.

40 Madera, residuos agrícolas, plantas de cultivo herbáceas, y desperdicios sólidos municipales han sido considerados como materias primas para la producción de etanol.

Estos materiales principalmente consisten en celulosa, hemicelulosa, y lignina.

Una vez la celulosa se convierte en glucosa, la glucosa es fácilmente fermentada por levadura en etanol.

Las xilanasas degradan beta-1,4-xilano en la xilosa, rompiendo así la hemicelulosa, uno de los componentes principales de las paredes celulares vegetales.

45 [0006] Hay una necesidad en la técnica de mejorar las composiciones de enzima celulolítica y hemicelulolítica a través de suplementación con enzimas adicionales para aumentar eficiencia y para proporcionar soluciones enzimáticas para degradar lignocelulosa.

50 Las xilanasas son conocidas de la técnica anterior. Una xilanasas de *Penicillium canescens* (Uniprot. C3VEV9) tiene 76.1% en identidad a la xilanasas descrita como SEC ID n.º: 2. Otra xilanasas de *Talaromyces stipitatus* (Uniprot. B8M9H8) tiene 76.5% identidad a la xilanasas descrita como SEC ID n.º: 4. Otra xilanasas de *Penicillium* sp (Uniprot. AYW51189) descrita en US2010124769-A1 tiene 84.0% en identidad a la xilanasas descrita como SEC ID n.º: 6.

55 [0007] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad de xilanasas y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

Resumen de la invención

60 [0008] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de xilanasas seleccionados del grupo consistente en:

(a) un polipéptido con al menos 85% identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; o la secuencia de ADNc del mismo;

65 (d) una variante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 que comprende una sustitución, deleción, y/o inserción en una o más (por ejemplo; varias) posiciones, donde el número no es más de 10; y

(e) un fragmento del polipéptido de (a); (b), o (c) que tiene actividad de xilanasas y donde un fragmento significa un fragmento que contiene al menos residuos de aminoácidos 18-364 de SEC ID n.º: 2.

5 [0009] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención; constructos de ácidos nucleicos; vectores de expresión recombinantes; células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos; y métodos para la producción de los polipéptidos.

10 [0010] La presente invención también se refiere a procesos para la degradación 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 de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención. Los procesos pueden comprender además el material celulósico degradado o convertido o material que contiene xilano.

15 [0011] La presente invención también se refiere a procesos 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 (por ejemplo; varios) microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

20 Definiciones

[0012] Xilanasas: 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.

25 Para fines de la presente invención, la actividad de degradación de xilano se determina por la medición del aumento en la hidrólisis de xilano de madera de abedul (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, MO, USA) 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 de acetato sódico pH 5, 50°C, 24 horas, análisis de azúcar usando ensayo de hidrácida de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) como se describe en Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal- Biochem 47: 273-279.

30 El polipéptido de la presente invención puede tener 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%, o al menos 100% de la actividad de xilanasas del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

35 El polipéptido de la presente invención puede tener 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%, o al menos 100% de la actividad de xilanasas del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 4. El polipéptido de la presente invención puede tener 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%, o al menos 100% de la actividad de xilanasas del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 6.

40 [0013] Acetilxilano esterasa: el término "acetilxilano esterasa" significa una carboxil esterasa (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.

45 Para fines de la presente invención, la 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 (monolaurato sorbitán de polioxietileno).

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

50 [0014] 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 polimorfismo dentro de poblaciones.

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

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

[0015] 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 alfa-L-arabinofuranosida terminales no reductores en alfa-L-arabinósidos.

60 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.

65 Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa es determinada usando el 5 mg de arabinoxilano de trigo de viscosidad media (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Ireland) por ml

de 100 mM de acetato sódico pH 5 en un volumen total de 200 µl durante 30 minutos a 40°C seguido de análisis de arabinosa por cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

[0016] 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 a 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 µmol de ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico por minuto a pH 5, 40°C.

[0017] Beta-glucosidasa: el término "beta-glucosidase" 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 es determinada usando el *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato según el procedimiento 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 µmol 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 con 0.01% TWEEN® 20.

[0018] 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)-xilooligosacáridos cortos para eliminar residuos de D-xilosa sucesivos de terminales no-reducidos.

Para fines de la presente invención, una unidad de beta-xilosidasa es definida como 1.0 µmol 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 con 0.01% TWEEN® 20.

[0019] ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura empalmada obtenida de una célula eucariótica o procariótica. ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes 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.

[0020] 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-ligada que contiene polímero, liberando celobiosa de la reducción o extremidades no-reducidas de la cadena (Teeri, 1997, Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology 15: 160-167; Teeri et al., 1998, Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178).

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 Tomme et al. puede utilizarse para determinar la actividad de celobiohidrolasa.

[0021] Material celulósico: el término "material celulósico" significa 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, producida después de que la célula haya dejado de crecer, también contiene polisacáridos y se refuerza por lignina polimérica de manera covalente reticulada a hemicelulosa.

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 es polimorfa, la celulosa es descubierta en tejido vegetal principalmente como una matriz cristalina insoluble de cadenas de glucano paralelas.

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

[0022] La celulosa es generalmente encontrada, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascotes, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de árboles.

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

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

Preferiblemente, el material celulósico es cualquier material de biomasa.

Preferiblemente, el material celulósico es lignocelulosa, que comprende celulosa, hemicelulosas y lignina.

5

[0023] El material celulósico puede ser residuo agrícola.

El material celulósico puede ser material herbáceo (incluyendo plantas de cultivo de energía).

El material celulósico puede ser residuos municipales sólidos.

El material celulósico puede ser pulpa y residuo de fábrica de papel.

10 El material celulósico puede ser papel de desecho.

El material celulósico puede ser madera (incluyendo residuo de silvicultura).

El material celulósico puede ser arundo.

El material celulósico puede ser bagazo.

El material celulósico puede ser bambú.

15 El material celulósico puede ser mazorca de maíz.

El material celulósico puede ser fibra de maíz.

El material celulósico puede ser forraje de maíz.

El material celulósico puede ser miscanthus.

El material celulósico puede ser piel de naranja.

20 El material celulósico puede ser paja de arroz.

El material celulósico puede ser pasto varilla.

El material celulósico puede ser paja de trigo.

[0024] El material celulósico puede ser álamo.

25 El material celulósico puede ser eucalipto.

El material celulósico puede ser abeto.

El material celulósico puede ser pino.

El material celulósico puede ser álamo.

El material celulósico puede ser acicalado.

30 El material celulósico puede ser sauce.

[0025] El material celulósico puede ser celulosa algal.

El material celulósico puede ser celulosa bacteriana.

El material celulósico puede ser linter de algodón.

35 El material celulósico puede ser papel de filtro.

El material celulósico puede ser celulosa microcristalina.

El material celulósico puede ser celulosa tratada con ácido fosfórico.

[0026] El material celulósico puede ser una biomasa acuática.

40 Como se utiliza en este caso el término "biomasa acuática" significa biomasa producida en un ambiente acuático por un proceso de fotosíntesis.

La biomasa acuática puede ser algas, plantas emergentes, plantas de hoja flotante, o plantas sumergidas.

[0027] El material celulósico se puede utilizar como está o se puede someter a pretratamiento, que usa métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en este caso.

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

[0028] Enzima celulolítica o celulasa: el término "enzima celulolítica" o "celulasa" significa una o más (por ejemplo varias) enzimas que hidrolizan un material celulósico.

50 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.

55 La 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 sustrato.

60 El ensayo fue establecido por la unión internacional de química aplicada y pura (IUPAC) (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

[0029] Para fines de la presente invención, la actividad enzimática celulolítica se determina por la medición del aumento en la hidrólisis de un material celulósico por enzima(s) celulolítica bajo las condiciones siguientes: 1-50 mg de proteína enzima celulolítica/g de celulosa en PCS (u otro material celulósico pretratado) durante 3-7 días a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, en comparación con una hidrólisis de control sin añadir proteína enzimática celulolítica.

65

Condiciones típicas son 1 ml reacciones, PCS lavado o sin lavar, 5% sólidos insolubles, 50 mM pH de acetato sódico 5,1 mM MnSO₄, 50°C, 55°C, o 60°C, 72 horas, análisis de azúcar por columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

- 5 [0030] 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 con un codón de inicio tal como ATG, GTG, o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG, o TGA.
- 10 La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.
En una forma de realización la secuencia codificante es las posiciones 1-240 y 314-1168 de SEC ID n.º: 1.
En otra forma de realización la secuencia codificante es las posiciones 1-241, 302-342, 404-452, 518-639, 707-852, 912-1019, 1088-1205, 1282-1347, y 1430-1708 de SEC ID n.º: 3.
En otra forma de realización la secuencia codificante es las posiciones 1-50, 114-270, 342-474, 567-680, 757-1520 de identidad de SEC n° 5.
- [0031] Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención.
Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o extranjera (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido nativo o extranjero entre sí.
Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia de poliadenilación líder, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción.
Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de terminación transcripcional y traslacional.
- 25 Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con motivo de introducir ligamiento facilitadores de sitios de restricción específicos de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica un polipéptido.
- [0032] 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, beta-1,4 enlaces en beta-1,3 glucanos mezclados tales como beta-D-glucanos o xiloglucanos de cereal, y otro material vegetal que contiene componentes celulósicos.
La actividad de endoglucanasa se puede determinar por la reducción de medición en la viscosidad de sustrato o aumento en la reducción de extremidades determinadas 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 carboximetilo de celulosa (CMC) como sustrato según el procedimiento Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268, a pH 5, 40°C.
- 40 [0033] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraducciona, y secreción.
- [0034] 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 está operativamente enlazado a secuencias de control que proveen a su expresión.
- 50 [0035] Glicósido hidrolasa de familia 61: el término "glicósido hidrolasa de familia 61" o "familia GH61" o "GH61" significa una polipéptido decreciente en la familia glicósido hidrolasa 61 según Henrissat, 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat and Bairoch, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.
Las enzimas en esta familia fueron originalmente clasificadas como una familia glicósido hidrolasa basada en medición de actividad de endo-1,4-beta-D-glucanasa muy débil en un miembro de la familia.
La estructura y modo de acción de estas enzimas son no canónicas y éstas no se pueden considerar como glicosidasas bona fide.
Sin embargo, se mantienen en la clasificación CAZy basándose en su capacidad para mejorar la descomposición de lignocelulosa cuando se usan conjuntamente con una celulasa o una mezcla de celulasas.
- 60 [0036] Feruloil esterasa: el término "feruloil esterasa" significa una hidrolasa de 4-hidroxi-3-metoxi-cinamoilo azúcar (EC 3.1.1.73) que cataliza la hidrólisis de grupos de 4-hidroxi-3-metoxicinamoil (feruloilo) azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en sustratos "natural", 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 cinamoilo, FAEA, cinnAE, FAE-I, o FAE-II.
Para fines de la presente invención, actividad feruloil esterasa es determinada usando el 0.5 mM *p*-nitrofenilferulato como sustrato en 50 mM de acetato sódico pH 5.0.
- 65

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.

[0037] Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro principal; donde el fragmento tiene actividad de xilanasas.

El fragmento puede contener al menos residuos de aminoácidos 18-364 de SEC ID n.º: 2.

El fragmento puede contener al menos residuos de aminoácidos 17-326 de SEC ID n.º: 4.

El fragmento puede contener al menos residuos de aminoácidos 21-337 de SEC ID n.º: 6.

[0038] Enzima hemicelulolítica o hemicelulasa: el término "enzima hemicelulolítica" o "hemicelulasa" significa una o más (por ejemplo, varias) enzimas que hidrolizan un material hemicelulósico.

Ver, por ejemplo, Shallom and Shoham, 2003, Microbial hemicellulases. Current Opinion In Microbiology 6(3): 219-228).

Las hemicelulasas son componentes clave en la degradación de la biomasa vegetal.

Ejemplos de hemicelulasas incluyen, pero de forma no limitativa, una esterasa de acetilmanano, una acetilxilano esterasa, 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.

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 éstos en una red robusta.

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

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

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

Estos módulos catalíticos, basados en homología de su secuencia primaria, se pueden asignar en las familias GH y CE.

Algunas familias, con un 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).

La actividades enzimáticas hemicelulolíticas se puede medir según Ghose and Bisaria, 1987, Pure & Appl. Chem. 59: 1739-1752 a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, y un pH adecuado, por ejemplo, 5.0 o 5.5.

[0039] Condiciones de astringencia altas: el término "condiciones de astringencia altas" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, 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 50% formamida, tras procedimientos de hibridación Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 65°C.

[0040] Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo celular que sea susceptible de transformación, transfección, transducción, o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vectores de expresión que comprenden 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 la replicación.

[0041] Aislado: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no ocurre en la naturaleza.

Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no ocurra de forma natural, (2) cualquier sustancia incluyendo, pero no limitado a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que es al menos parcialmente quitado de uno o varios o todos los constituyentes de origen natural con los cuales se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificado por la mano del hombre con respecto a la sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales está naturalmente asociada (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica de la sustancia).

Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

[0042] Condiciones de astringencia bajas: el término "condiciones de astringencia bajas" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25% formamida, tras procedimientos de hibridación Southern estándar durante de 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 50°C.

5 [0043] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 18 a 364 de SEC ID n.º: 2 basado en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que aminoácidos 1 a 17 de SEC ID n.º: 2 son un péptido señal.

10 En otro aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 17 a 389 de SEC ID n.º: 4 basado en el programa SignalP que predice que aminoácidos 1 a 16 de SEC ID n.º: 4 son un péptido señal.

En otro aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 21 a 405 de SEC ID n.º: 6 basado en el programa SignalP que predice que aminoácidos 1 a 20 de SEC ID n.º: 6 son un péptido señal.

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

15 [0044] Secuencia codificante de polipéptido maduro: el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de xilanas.

20 La secuencia codificante de polipéptido maduro puede ser nucleótidos 52 a 1165 de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADNc de los mismos basada en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice que nucleótidos 1 a 51 de SEC ID n.º: 1 codifican un péptido señal.

La secuencia codificante de polipéptido maduro puede ser nucleótidos 49 a 1705 de SEC ID n.º: 3 o la secuencia de ADNc de los mismos basada en el programa SignalP que predice que nucleótidos 1 a 48 de SEC ID n.º: 3 codifican un péptido señal.

25 La secuencia codificante de polipéptido maduro puede ser nucleótidos 124 a 1517 de SEC ID n.º: 5 o la secuencia de ADNc de los mismos basada en el programa SignalP que predice que nucleótidos 1 a 123 de SEC ID n.º: 5 codifican un péptido señal.

30 [0045] Dominio catalítico: el término "dominio catalítico" significa la porción de una enzima que contiene la maquinaria catalítica de la enzima.

[0046] Dominio de enlace a la celulosa: el término "dominio de enlace a la celulosa" significa la porción de una enzima que media la unión de la enzima a regiones amorfas de un sustrato de celulosa.

El dominio de enlace a la celulosa (CBD) se encuentra bien en el N-terminal o en la extremidad C-terminal de una enzima.

35 Un CBD se conoce también como un módulo de unión de celulosa o CBM.

En una forma de realización, el CBM es aminoácidos 354 a 389 de SEC ID n.º: 4.

En una forma de realización, el CBM es aminoácidos 370 a 405 de SEC ID n.º: 6.

El CBM está separado del dominio catalítico por una secuencia enlazadora.

El enlazador es en una forma de realización aminoácidos 327 a 353 de SEC ID n.º: 4.

40 El enlazador es en una forma de realización aminoácidos 338 a 369 de SEC ID n.º: 6.

[0047] Condiciones de astringencia media: el término "condiciones de astringencia media" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% formamida, tras procedimientos de hibridación Southern estándar durante de 12 a 24 horas.

45 El material portador es finalmente lavado tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 55°C.

[0048] Condiciones de astringencia medio altas: el término "condiciones de astringencia medio altas" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y bien 35% formamida, tras procedimientos de hibridación Southern estándar durante de 12 a 24 horas.

50 El material portador es finalmente lavado tres veces cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 60°C.

55 [0049] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una forma que no existirán en la naturaleza de otro modo o que son sintéticos, que comprende una o varias secuencias de control.

60 [0050] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la 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 codificante.

[0051] Polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica: el término "polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica" significa un polipéptido GH61 que cataliza la mejora de la hidrólisis de un material celulósico por enzima con actividad celulolítica.

Para fines de la presente invención, la actividad de mejora celulolítica se determina por la medición del aumento en azúcares reductores o el aumento del total de celobiosa y glucosa de la hidrólisis de un material celulósico por enzima celulolítica bajo las condiciones siguientes: 1-50 mg de total proteína/g de celulosa en PCS, donde la 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 una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, y pH adecuad, por ejemplo, 5.0 o 5.5, 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).

Preferiblemente, una mezcla de CELLUCLAST® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) en presencia de 2-3% de peso de proteína total beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (recombinantemente producida en *Aspergillus oryzae* según WO 02/095014) o 2-3% de peso de proteína total beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (recombinantemente producida en *Aspergillus oryzae* como se describe en WO 02/095014) de carga de proteína de celulasa se usa como la fuente de la actividad celulolítica.

[0052] Los polipéptidos GH61 con 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 veces, por ejemplo, al menos 1.05 veces, al menos 1.10 veces, al menos 1.25 veces, al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces.

[0053] 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 diluido, pretratamiento alcalino, o pretratamiento neutral.

[0054] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad de secuencia".

[0055] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos es determinada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o más avanzada.

Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5, y el matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

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

$$\text{(Residuos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento - Número total de espacios en alineamiento)}$$

[0056] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas es determinada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, supra) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior.

Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5, y el matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4).

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

$$\text{(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento - Número total de espacios en alineamiento)}$$

[0057] Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante de polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de xilanasas.

En un aspecto, una subsecuencia corresponde al polinucleótido que codifica el dominio catalítico.

[0058] Variante: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de xilanasas que incluyen una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección, en una o más (por ejemplo varias) posiciones.

Una sustitución significa una sustitución del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una eliminación significa una delección del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir un aminoácido adyacente a e inmediatamente siguiente al aminoácido que ocupa una posición.

[0059] Condiciones de astringencia muy altas: el término "condiciones de astringencia muy altas" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% formamida, tras procedimientos de hibridación Southern estándar durante de 12 a 24 horas.

5 El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 70°C.

[0060] Condiciones de astringencia muy bajas: el término "condiciones de astringencia muy bajas" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, 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 25% formamida, tras procedimientos de hibridación Southern estándar durante de 12 a 24 horas.

10 El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 45°C.

[0061] Material que contiene xilano: el término "material que contiene xilano" significa cualquier material que comprende un polisacárido de pared de célula de planta con un esqueleto de residuos de xilosa beta-(1-4)-enlazada. Xilanos de plantas terrestres son heteropolímeros que poseen un esqueleto de beta-(1-4)-D-xilopiranosas, que se ramifica por cadenas cortas de carbohidrato.

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.

20 Polisacáridos tipo xilano se pueden dividir en homoxilanos y heteroxilanos, que incluyen glucuronoxilanos, (arabino)glucuronoxilanos, (glucurono)arabinoxilanos, arabinoxilanos, y heteroxilanos complejos.

Ver, por ejemplo, Ebringerova et al., 2005, Adv. Polym. Sci. 186: 1-67.

25 [0062] En los procesos de la presente invención, cualquier material que contiene xilano puede ser utilizado.

En un aspecto preferido, el material que contiene xilano es lignocelulosa.

[0063] 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.

30 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-glucuronil).

35 El progreso reciente en ensayos de enzimas xilanolíticas fue resumido en diferentes publicaciones incluyendo Biely and Puchard, 2006, Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes, 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 et al., 1997, The beta-D-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase, Biochemical Journal 321: 375-381.

[0064] La actividad de degradación de xilano total se puede medir por la determinación de los azúcares reductores formados de varios tipos de xilano, incluyendo, por ejemplo, xilanos de espelta de avena, madera de haya, y madera de alerce, o por determinación fotométrica de fragmentos de xilano teñido liberado de varios xilanos teñidos de manera covalente.

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

45 La actividad de xilanasa puede también ser determinada con 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 0,01% TRITON® X-100 (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)glicol fenil-polietileno) y 200 mM de tampón de fosfato sódico pH 6 a 37°C.

50 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 como sustrato en 200 mM tampón de pH 6 de fosfato sódico.

[0065] Para fines de la presente invención, la actividad de degradación de xilano se determina por la 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 de acetato sódico pH 5, 50°C, 24 horas, análisis de azúcar que usa ensayo hde idrácida de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) como se describe por Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal. Biochem 47: 273-279.

60 Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de xilanasa

[0066] En una forma de realización, 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 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 xilanasa.

En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

5 [0067] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento del mismo con actividad de xilanasas.

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

En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 18 a 364 de SEC ID n.º: 2.

10 [0068] El polinucleótido de SEC ID n.º: 1, o una subsecuencia del mismo, al igual que el polipéptido de SEC ID n.º: 2, o un fragmento del mismo, 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 diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, tras procedimientos de hibridación Southern de estándar, identificación y
15 aislamiento del gen correspondiente ahí.

Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían tener al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de 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
20 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud.

Pueden usarse tanto sondas de ADN como de ARN.

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

Tales sondas se abarcan por la presente invención.

25 [0069] Una genoteca de ADN genómico o ADNc obtenido a partir de tales otras cepas se pueden consultar en busca de ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de xilanasas. ADN genómico u otro de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación.

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

Para identificar un clon o ADN que hibridiza con SEC ID n.º: 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia Southern.

35 [0070] Para fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido hibridiza a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con (i) SEC ID n.º: 1 (ii) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 (iii) la secuencia de ADNc de la misma; (iv) el complemento en toda su longitud de la misma; o (v) una subsecuencia de la misma; en condiciones de astringencia muy bajas a muy altas.

40 Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, una película radiográfica o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

[0071] La sonda de ácidos nucleicos puede ser un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID n.º: 2; el polipéptido maduro del mismo; o un fragmento del mismo.

La sonda de ácidos nucleicos puede ser SEC ID n.º: 1; o la secuencia de ADNc de la misma.

45 La sonda de ácidos nucleicos puede ser el polinucleótido contenido en la cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS 398.68, donde el polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de xilanasas.

[0072] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado con actividad de xilanasas codificada por un polinucleótido con una identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, o a la secuencia de ADNc de la misma, de al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%,
50 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%.

[0073] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o más (por ejemplo varias) posiciones.

En una forma de realización, el número de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones introducidas en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, no es más de 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.

60 Los cambios de aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al plegado y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de 1-30 ácidos de amino; amino pequeño o extensiones terminadas carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación por la carga de red de cambio u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

65 [0074] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en los grupos 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

5 Sustituciones comunes 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.

[0075] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos son alterados.

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

[0076] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido 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).

15 En la técnica anterior, las mutaciones de alanina única se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan en busca de 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.

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

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.

25 La identidad de los aminoácidos esenciales también puede ser inferida de una alineación con un polipéptido relacionado.

[0077] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones, y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido 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; o WO 95/22625.

30 Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, 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).

35 [0078] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896).

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

[0079] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término de una región de otro polipéptido.

45 [0080] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión 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 de fusión se produce por la fundición de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención.

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

Los polipéptidos de fusión también pueden ser construidos utilizando tecnología de inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, *EMBO J.* 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, *Science* 266: 776-779).

55 [0081] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando los dos polipéptidos.

60 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.

65 Fuentes de polipéptidos con actividad de xilanasas

[0082] 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.

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

[0083] El polipéptido pueden ser un polipéptido de *Talaromyces*.

[0084] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Talaromyces leycettanus*, por ejemplo, un polipéptido obtenido de cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68.

[0085] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especies por los que se los conoce.

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

[0086] Las cepas de estas especies son fácilmente accesible al público en un número de colecciones de cultivo, tales como 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).

[0087] El polipéptido se puede identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas arriba.

Las técnicas para el aislamiento de microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales se conocen en la técnica. Un polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego ser obtenido por selección de forma similar de una genoteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado.

Una vez un polinucleótido que codifica un polipéptido ha sido detectado con la sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar por la utilización de técnicas que se conocen por aquellos técnicos en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Dominios catalíticos

[0088] La presente aplicación también divulga polipéptidos aislados que comprenden un dominio catalítico seleccionado del grupo consistente en:

(a) un dominio catalítico con al menos 77% de identidad de secuencia al dominio catalítico de SEC ID n.º: 2 (por ejemplo, aminoácidos 18 a 364 de SEC ID n.º: 2);

(b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido con al menos 60% de identidad de secuencia a la secuencia codificante de dominio catalítico de SEC ID n.º: 1 (por ejemplo, nucleótidos 52-240, y 314-1165 de SEC ID n.º: 1);

(c) una variante de un dominio catalítico que comprende una sustitución, deleción, y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del dominio catalítico de SEC ID n.º: 2; y

(d) un fragmento de un dominio catalítico de (a); (b), o (c), que tiene actividad de xilanasas.

[0089] El dominio catalítico tiene preferiblemente un grado de identidad de secuencia al dominio catalítico de SEC ID n.º: 2, de al menos 60%, 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 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%.

El dominio catalítico preferiblemente comprende o consiste en el dominio catalítico de SEC ID n.º: 2 o una variante alélica del mismo; o es un fragmento del mismo con actividad de xilanasas.

En otro aspecto preferido, el dominio catalítico comprende o consiste en los aminoácidos 18 a 364 de SEC ID n.º: 2.

[0090] El dominio catalítico se puede codificar por un polinucleótido que hibridiza en condiciones de astringencia muy bajas, o condiciones de astringencia bajas, o condiciones de astringencia medias, o condiciones de astringencia medio altas, o condiciones de astringencia altas, o condiciones de astringencia muy altas (como definido arriba) con (i) la secuencia codificante de dominio catalítico de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante de dominio catalítico de SEC ID n.º: 1, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii) (J. Sambrook et al., 1989, supra).

[0091] El dominio catalítico se puede codificar por un polinucleótido con un grado de identidad de secuencia a la secuencia codificante de dominio catalítico de SEC ID n.º: 1 de al menos 60%, 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 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que codifica un polipéptido con actividad de xilanasas.

[0092] El polinucleótido que codifica el dominio catalítico puede comprender o consistir en nucleótidos 52 a 1165 de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADNc de los mismos.

En particular el polinucleótido que codifica el dominio catalítico puede comprender o consistir en nucleótidos 52-240, y 314-1165 de SEC ID n.º: 1.

5

Polinucleótidos

[0093] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención, como se describe en este caso.

10

[0094] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico o ADNc, o una combinación de los mismos.

La clonación de los polinucleótidos de ADN genómico puede ser efectuada, 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.

15

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

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

20

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

[0095] Las modificaciones de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención pueden ser necesarias para sintetizar polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido.

25

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

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 similares.

Las variantes se pueden construir en base al polinucleótido presentado como la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, o la secuencia de ADNc de la misma, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de 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 a la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótido que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente.

30

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

35

Constructos de ácidos nucleicos

[0096] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazada a una o varias secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatible con las secuencias de control.

40

[0097] Un polinucleótido se puede manipular de una variedad de formas para proveer a expresión del polipéptido.

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

45

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

[0098] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

50

El promotor 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 incluyendo promotores mutantes, truncados, y híbridos, y puede ser obtenido de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogo a la célula huésped.

55

[0099] 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), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), genes xylA y xylB de *Bacillus*, gen de *Bacillus thuringiensis crIII A* (Agaisse and Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), operón de *E. coli lac*, promotor de *E. coli trc* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), 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 el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25).

60

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

65

Ejemplos de promotores en tándem se describen en WO 99/43835.

[0100] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidas 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 I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa de *Trichoderma reesei* I, xilanasa de *Trichoderma reesei* II, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de un *Aspergillus nidulans* o gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.

[0101] 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*.
 Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritas por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0102] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que se reconoce por una célula huésped para terminar transcripción.
 El terminador está operativamente enlazado al término 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido.
 Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped se puede utilizar en la presente invención.

[0103] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas son obtenidas de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (aprH), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), y ARN ribosómico de *Escherichia coli* (rrnB).

[0104] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas 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*.

[0105] Los 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*.
 Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, supra.

[0106] La secuencia de control también puede ser una región de estabilizador de ARNm abajo de un promotor y arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0107] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas son obtenidos de un gen de *Bacillus thuringiensis* *crIII*A (WO 94/25612) y un gen de *Bacillus subtilis* SP82 (Hue et al., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

[0108] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped.
 El líder está operativamente enlazado al 5'-termino del polinucleótido que codifica el polipéptido.
 Cualquier líder que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

[0109] Los 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*.

[0110] Los 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 dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0111] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazado al término 3' del polinucleótido y, cuando transcrito, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito.

Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizada.

5 [0112] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glicosidasa de *Aspergillus niger* TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0113] Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo and Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

10 [0114] La secuencia de control también puede ser una región codificante del 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 extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido.

15 Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es extranjera a la secuencia codificante.

Una secuencia codificante del péptido señal foráneo puede ser requerida donde la secuencia codificante naturalmente no contiene una secuencia codificante del péptido señal.

20 Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foráneo puede sencillamente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido.

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

25 [0115] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus 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.

30 [0116] Las 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*.

35 [0117] Los 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.

40 [0118] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del 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.

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

50 [0119] Donde ambos péptido señal y secuencias de propéptido están presentes, 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.

[0120] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulan la expresión del polipéptido relativamente al crecimiento de la célula huésped.

55 Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan expresión del gen por encender o apagar en respuesta a un estímulo químico o físico, con la presencia de un compuesto regulador.

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

En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 pueden ser utilizados.

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

60 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.

65 Vectores de expresión

[0121] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de terminación transcripcional y traslacional.

Las varias secuencias de nucleótido y control se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o varios sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifican el polipéptido en tales sitios.

Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión.

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

[0122] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o viral) que puede estar convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueden provocar expresión del polinucleótido.

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

El vector puede ser un plásmido lineal o cerrado circular.

[0123] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.

El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación.

Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y es replicado 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 por introducir el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede ser utilizado.

[0124] El vector contiene preferiblemente uno o varios marcadores seleccionables que permiten selección fácil de células transformadas, modificadas, transducidas o similares.

Una etiqueta seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

[0125] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* *dal*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomycin, o tetraciclina.

Marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3.

Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (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.

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

[0126] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0127] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender la secuencia que codifica el polinucleótido del polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no-homóloga.

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

Para aumentar la probabilidad de integración a una ubicación precisa, los elementos integracionales 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.

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 polinucleótidos no codificadores o codificadores.

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

[0128] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además el origen de replicación permitiendo al vector replicar autónomamente en la célula huésped en cuestión.

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

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

5 [0129] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten replicación en el *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1 que permiten replicación en el *Bacillus*.

10 [0130] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen 2 de micra de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

10 [0131] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883).

15 El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden realizar según los métodos de WO 00/24883.

15 [0132] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido.

20 Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido por la 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 así copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar por el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

25 [0133] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (see, e.g., Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

30 [0134] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención.

35 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.

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

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

40 [0135] 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.

45 [0136] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*. Bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *helicobacteria*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.

50 [0137] 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*.

55 [0138] La célula huésped bacteriana también puede ser una célula de *Streptococcus* incluyendo, pero no limitado a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi subesp. Zooepidemicus*.

60 [0139] La célula huésped bacteriana también puede ser célula de *Streptomyces* incluyendo, pero no limitado a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

65 [0140] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar mediante transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (ver, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, or Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278).

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

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

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

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

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

[0141] La célula huésped también puede ser eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta, o fúngica.

20 [0142] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye el phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota al igual que la Oomycota y todos los hongos mitospóricos (como definido por Hawkswort et al., en Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK).

25 [0143] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes).

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

35 [0144] 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*, *Saccharomyces oviformis norbensis*, o *Yarrowia lipolytica*.

[0145] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como definido por Hawkswort et al., 1995, supra).

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

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

En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* por el injerto de un talo unicelular y catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

45 [0146] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaportia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

50 [0147] 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 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*, *Coriolus hirsutus*, *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*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

65

[0148] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular de una forma conocida de por sí.

Los procedimientos adecuados para transformación de *Aspergillus* y células huésped de *Trichoderma* son descritas 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.

Los métodos adecuados para transformar especies de fusarium son descritas por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787.

La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. 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; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0149] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) el cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

La célula pueden ser una célula de *Talaromyces*.

Preferiblemente, la célula es una célula de *Talaromyces leycettanus*.

De la forma más preferible, la célula es de la cepa CBS398.68 de *Talaromyces leycettanus*.

[0150] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende (a) el cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

[0151] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a escala pequeña o a gran escala (incluyendo fermentaciones continua, de lote, de alimentación por lotes, o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales en un medio adecuado y en condiciones que permiten al polipéptido ser expresado y/o aislada.

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

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 lisados de célula.

[0152] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos.

Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no limitativa, 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.

[0153] 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 limitados a, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

[0154] El polipéptido se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatofoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

[0155] En un aspecto alternativo, el polipéptido no es recuperado, sino que una célula huésped de la presente invención que expresa el polipéptido se usa como una fuente del polipéptido.

Plantas

[0156] La presente invención también se refiere a una planta, parte de planta, o célula vegetal transgénica, que comprende un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir un polipéptido o dominio en cantidades recuperables.

El polipéptido o dominio se puede recuperar de la planta o parte de planta.

Alternativamente, la planta o parte de planta con el polipéptido o dominio se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, para mejorar el valor nutricional, la palatabilidad, y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

- 5 [0157] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (un dicot) o monocotiledónea (un monocot). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como hierba del prado (*Poa pratense*, *Poa*), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, tal como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz (choclo).
- 10 [0158] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (de la familia Brassicaceae), tales como coliflor, semilla de colza, y el organismo de modelo muy relacionado *Arabidopsis thaliana*.
- 15 [0159] Ejemplos de partes de planta son tallo, 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.
Los compartimentos específicos de célula vegetal, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma, son también considerados como parte de la planta.
Además, cualquier célula vegetal, sea cual sea el origen del tejido, se considera una parte de la planta.
- 20 Asimismo, las partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semilla.
- 25 [0160] También se incluye dentro del campo de la presente invención el descendiente de tales plantas, las partes de planta y las células vegetales.
- [0161] La planta transgénica o la expresión de célula vegetal del polipéptido o dominio se puede construir de acuerdo con métodos conocida en la técnica. Para resumir, la planta o célula vegetal se construye por incorporación de uno o varios constructos de expresión que codifican el polipéptido o dominio en el genoma de huésped de planta o genoma de cloroplasto y propagando la planta modificada o célula vegetal resultante en una planta transgénica o célula vegetal.
- 30 [0162] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de planta elegida.
Además, el constructo de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para la identificación de células vegetales en las que el constructo de expresión ha sido integrados y secuencias de ADN necesarias para introducir la construcción en la planta en cuestión (esto último depende del método de introducción de ADN usado).
- 35 [0163] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o tránsito, es determinado, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo se desea expresar el polipéptido o dominio.
Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido o dominio puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específico de fase o tejido, y el producto génico puede ser dirigido a un tejido específico o parte de
- 40 planta tales como semillas u hojas.
Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.
- 45 [0164] Para expresión constitutiva, se pueden utilizar el 35S-CaMV, la ubiquitina-1 de maíz, o el promotor de actina de arroz 1 (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).
Promotores específicos a un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards and Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla como promotores de glutelina, prolamina, globulina, o 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 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), el promotor de la proteína de almacenamiento *napA* *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772.
- 50 Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor de *rbcS* de arroz o tomate (Kyojuka et al., 1993, *Physiol de planta.* 102: 991-1000), el promotor de gen de metiltransferasa de adenina de virus de chlorella (Mittra and Higgins, 1994, *Plant Mol. Biol.* 26: 85-93), el gen promotor *aldP* de arroz (Kagaya et al., 1995, *Mol. Gen. Genet.* 248: 668-674), o un promotor inducible dañado como el promotor patata *pin2* (Xu et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 22: 573-588).
- 60

Asimismo, el promotor se puede inducir por tratamientos abióticos tales como alteraciones en la temperatura, sequía, o salinidad o inducidas 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.

5 [0165] Un elemento intensificador del promotor también puede ser usado para conseguir expresión más alta de un polipéptido o dominio 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 o dominio.
 Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra, revela el uso del primer intrón del gen de actina de arroz 1 para mejorar la
 10 expresión.

[0166] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir aquellos disponible en la técnica.

15 [0167] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocido 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).

20 [0168] La transferencia de gen mediado por *Agrobacterium tumefaciens* es un método para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, ver Hooykas and Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y para la transformación de monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación se pueden utilizar para estas plantas. Un método para generar monocotiledóneas transgénicas es bombardeo de partícula (oro microscópico o partículas de tungsteno recubierto con el ADN de transformación) de callos embrionarios o embriones de desarrollo (Christou,
 25 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 la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh et al., 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428.

Los métodos de transformación adicional incluyen aquellos descritas en patentes US Nº. 6,395,966 y 7,151,204.

30 [0169] Tras la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas enteras según métodos bien conocido en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, co-transformación con dos constructos de T-ADN separado o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.
 35

[0170] Además de la transformación directa de un genotipo de planta particular con una construcción de la presente invención, las plantas transgénicas pueden ser hechas por el cruce de una planta con la construcción a una segunda planta que no tiene la construcción.

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

Por lo tanto, la presente invención abarca no solo una planta directamente regenerada de células que ha sido transformada conforme a la presente invención, sino también el descendiente de tales plantas.

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

Tal descendiente puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención.

Cruzar produce la introducción de un transgen en una línea de planta por cruce polinizando una línea de inicio con una línea de planta donante.

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

50 [0171] La planta se puede generar mediante un proceso de conversión de retrocruce.
 Por ejemplo, las plantas incluyen plantas referidas como un genotipo, línea, innato, o híbrido convertido retrocruce.

55 [0172] Los marcadores genéticos se pueden utilizar para ayudar en la introgresión de uno o varios transgenes de la invención de un contexto genético a otro.

La selección ayudada por marcadores ofrece ventajas con respecto a cultivo convencional en que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas.

Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en el descendiente individual de un cruce particular.

60 Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que de otro modo tiene un contexto genético no agrónomicamente deseable se cruza con progenitores élitos, marcadores genético se pueden utilizar para seleccionar descendientes que no solo posean la característica de interés, sino también tengan una proporción relativamente grande del germoplasma deseado.

65 De esta manera, el número de generaciones requerido para introgresar uno o varios rasgos en un contexto genético particular se ve minimizado.

[0173] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprende (a) el cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido o dominio en condiciones propicias para la producción del polipéptido o dominio; y (b) la recuperación del polipéptido o dominio.

5

Composiciones

[0174] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

10 Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal polipéptido.

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

[0175] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático mayor, por ejemplo, una composición monocomponente.

15

Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una o más (por ejemplo; varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, una hemicelulasa, polipéptido GH61, una expansina, una esterasa, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

20

[0176] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o de una composición seca.

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

25

El polipéptido que se incluye en la composición se puede estabilizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

[0177] Más abajo se presentan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención.

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

30

Usos

[0178] La presente invención está también dirigida a los procesos siguientes para utilizar polipéptidos con actividad de xilanasas, o composiciones de los mismos.

35

[0179] La presente invención también se refiere a procesos para la degradación 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 de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención.

40

Los procesos pueden comprender además recuperar el material celulósico degradado o convertido o el material que contiene xilano.

Productos solubles de degradación o conversión del material celulósico o material que contiene xilano se pueden separar de material celulósico insoluble o material que contiene xilano usando un método conocido en la técnica tal como, por ejemplo, centrifugación, filtración, o asentamiento de gravedad.

45

[0180] La presente invención también se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación, que comprende: (a) la 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) la fermentación del material celulósico sacarificado o material que contiene xilano con uno o más (por ejemplo, varios) microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y (c) la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

50

[0181] La presente invención también se refiere a procesos 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 (por ejemplo, varios) microorganismos fermentadores, donde el material celulósico o material que contiene xilano se sacarifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de xilanasas de la presente invención.

55

La fermentación del material celulósico o material que contiene xilano puede producir un producto de fermentación.

Los procesos pueden comprender además el producto de fermentación de la fermentación.

60

[0182] Los procesos de la presente invención pueden utilizarse para sacarificar el material celulósico o material que contiene xilano en azúcares fermentables y para convertir azúcares fermentables en muchos productos de fermentación útiles, por ejemplo, combustible, etanol potable, y/o productos químicos de plataforma (por ejemplo, ácidos, alcoholes, cetonas, gases, y similares).

65

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

[0183] El procesamiento del material celulósico o material que contiene xilano según la presente invención se puede realizar usando métodos convencional en la técnica. Además, los procesos de la presente invención se pueden implementar utilizando cualquier equipo de tratamiento de biomasa convencional configurado para operar conforme a la invención.

[0184] Hidrólisis (sacarificación) y fermentación, separadas o simultáneas, incluyen, pero de forma no limitativa, hidrólisis y fermentación separadas (SHF); sacarificación y fermentación simultáneas (SSF); sacarificación y co-fermentación simultáneas (SSCF); hidrólisis y fermentación híbridas (HHF); hidrólisis y co-fermentación separadas (SHCF); hidrólisis y co-fermentación híbridas (HHCF); y conversión microbiana directa (DMC), a veces también llamada bioprocesamiento consolidado (CBP).

SHF usa pasos separados de proceso para hidrolizar primero enzimáticamente el material celulósico o el material que contiene xilano en azúcares fermentables, por ejemplo, glucosa, celobiosa, y monómeros de pentosa, y luego fermentar los azúcares fermentables en etanol.

En SSF, la hidrólisis enzimática del material celulósico o material que contiene xilano y la fermentación de azúcares en 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 co-fermentación 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 y de hidrólisis simultáneos, que pueden 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, hidrólisis, y fermentación enzimática) en uno o más (por ejemplo, varios) pasos donde el mismo organismo se utiliza para producir enzimas para convertir el material celulósico o material que contiene xilano en azúcares fermentables y para convertir azúcares fermentables en un producto final (Lynd et al., 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 66: 506-577).

Se entiende aquí que cualquier método conocido en la técnica que comprende pretratamiento, hidrólisis enzimática (sacarificación), fermentación, o una combinación de las mismas, se puede usar en la práctica de los procesos de la presente invención.

[0185] Un equipo convencional puede incluir un reactor agitado alimentado en lote, 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 and Sinityn, 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 and Lee, 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65), o un reactor con agitado intensivo inducido por un campo electromagnético (Gusakov et al., 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 adicionales incluyen reactores tipo lecho fluidizado, cortina ascendente, inmovilizados, y extrusores para hidrólisis y/o fermentación.

[0186] Pretratamiento. Al poner en práctica los procesos de la presente invención, cualquier proceso de pretratamiento conocido en la técnica puede utilizarse para interrumpir componentes de pared celular vegetal del material celulósico o material 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-Biofrp.* 2: 26-40).

[0187] El material celulósico o material que contiene xilano puede también ser sometido a reducción de tamaño de partícula, tamizado, pre-remojo, humidificación, lavado, y/o preparación antes del pretratamiento usando métodos conocidos en la técnica.

[0188] 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, CO₂ supercrítico, H₂O supercrítico, ozono, líquido iónico, y pretratamientos de irradiación gamma.

[0189] El material celulósico o material que contiene xilano se puede pretratar antes de hidrólisis y/o fermentación. El 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.

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

[0190] Pretratamiento con vapor.

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

El material celulósico o material que contiene xilano se pasa a o a través de un recipiente de reacción donde el vapor se inyecta para aumentar la temperatura a la temperatura y presión requeridas y se retiene allí durante el tiempo de reacción deseado.

El pretratamiento con vapor es preferiblemente realizado a 140-250°C, por ejemplo, 160-200°C o 170-190°C, donde el rango de temperatura óptima depende de la adición de un catalizador químico.

El periodo de permanencia para el pretratamiento con vapor es preferiblemente de 1-60 minutos, por ejemplo, 1-30 minutos, 1-20 minutos, 3-12 minutos, o 4-10 minutos, donde el periodo de permanencia óptimo depende del rango de temperatura y la adición de un catalizador químico.

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

El pretratamiento con vapor es frecuentemente combinado con una secreción explosiva del material después del pretratamiento, que es conocido como explosión de vapor, es decir, resorte intermitente 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. 2002/0164730).

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

La lignina es quitada solo hasta cierto punto.

[0191] Pretratamiento químico: el término "pretratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

Tal pretratamiento puede convertir celulosa cristalina en celulosa amorfa.

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, líquido iónico (APR), y pretratamientos organosolv.

[0192] Un catalizador tal como H₂SO₄ o SO₂ (típicamente 0.3 a 5% p/p) es frecuentemente añadido antes del pretratamiento de vapor, lo que reduce el tiempo y la temperatura, aumenta la recuperación, y mejora la 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).

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

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 cama 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).

[0193] Diferentes métodos de pretratamiento en condiciones alcalinas también pueden usarse.

Estos pretratamientos alcalinos incluyen, pero de forma no limitativa, hidróxido sódico, cal, oxidación en húmedo, filtración de amoníaco (APR), y explosión por congelación de la fibra de amoníaco (AFEX).

[0194] El pretratamiento de cal se realiza con óxido de calcio o hidróxido cálcico a temperaturas de 85-150°C y tiempos de permanencia de 1 hora a varios días (Wyman et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 1959-1966; Mosier et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 673-686).

WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900, y WO 2006/110901 revelan métodos de pretratamiento que usan amoníaco.

[0195] La oxidación en húmedo es un pretratamiento térmico realizado típicamente a 180-200°C durante 5-15 minutos añadiendo 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 preferiblemente a 1-40% de sustancia seca, por ejemplo, 2-30% de sustancia seca o 5-20% de sustancia seca, y frecuentemente el pH inicial se aumenta al añadir álcali tales como carbonato de sodio.

5 [0196] Una modificación del método de pretratamiento de oxidación en húmedo, conocido como explosión en húmedo (combinación de oxidación en húmedo y explosión de vapor) puede manejar sustancia seca hasta 30%. En la explosión en húmedo, el agente oxidante se introduce durante pretratamiento después de un determinado tiempo de permanencia. El pretratamiento se termina entonces con el parpadeo a presión atmosférica (WO 2006/032282).

10 [0197] La explosión de fibra de amoníaco (AFEX) implica tratamiento del material celulósico o material que contiene xilano con líquido o amoníaco gaseoso a temperaturas moderadas tales como 90-150°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).
15 Durante el pretratamiento AFEX, la celulosa y las hemicelulosas permanecen relativamente intactas. Los complejos de lignina-carbohidrato son divididos.

20 [0198] El pretratamiento Organosolv delignifica el material celulósico o material 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). El ácido sulfúrico es normalmente añadido como un catalizador. En el pretratamiento organosolv, se quita la mayoría de hemicelulosa y lignina.

25 [0199] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuado son descritos por Schell et al., 2003, Appl. Biochem. and Biotechnol. 105-108: 69-85, and Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686, and U.S. Published Application 2002/0164730.

30 [0200] El pretratamiento químico es preferiblemente realizado como un tratamiento de ácido diluido, y más preferiblemente como un tratamiento de ácido diluido continuo. El ácido es típicamente sulfúrico, pero pueden usarse también otros ácidos, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno, o mezclas derivadas. El tratamiento de ácido moderado se lleva a cabo en el margen de un pH de preferiblemente 1-5, por ejemplo, 1-4 o
35 1-2.5. La concentración de ácido puede estar preferiblemente en el rango de 0.01 a 10 % en peso ácido, por ejemplo, de 0.05 a 5 % en peso ácido o de 0.1 a 2 % en peso ácido. El ácido se pone en contacto con el material celulósico o material que contiene xilano y es mantenido a una temperatura preferiblemente en el rango de 140-200°C, por ejemplo, 165-190°C, durante periodos que varían de 1 a
40 60 minutos.

[0201] El pretratamiento puede ocurrir en un compuesto acuoso acuoso. Preferiblemente, el material celulósico o material que contiene xilano está presente durante el pretratamiento en cantidades preferiblemente entre 10-80 % en peso, por ejemplo, 20- 70 % en peso o 30-60 % en peso, tal como
45 alrededor de 40 % en peso. El material celulósico o material que contiene xilano pretratado puede estar sin lavar o lavado utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, lavado con agua.

[0202] El pretratamiento mecánico o pretratamiento físico: el término "pretratamiento mecánico" o "pretratamiento físico" se refiere a cualquier pretratamiento que promueve reducción de tamaño de partículas. Por ejemplo, tal pretratamiento puede implicar varios tipos de la trituración o fresado (por ejemplo, molienda en seco, molienda en húmedo, o fresado de bola vibratoria).

[0203] El material celulósico o material que contiene xilano se puede pretratar tanto físicamente (mecánicamente) como químicamente. El pretratamiento mecánico o físico se puede acoplar con tratamiento de explosión de vaporización, hidrotermólisis, diluido o ácido moderado, alta temperatura, tratamiento de alta presión, irradiación (por ejemplo, irradiación de microondas), o combinaciones de los mismos. Alta presión puede significar presión en el rango de preferiblemente aproximadamente 100 a aproximadamente 400
55 psi, por ejemplo, de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 psi. Alta temperatura puede significar temperaturas en el rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 300°C, por ejemplo, de aproximadamente 140 a aproximadamente 200°C. Preferiblemente, pretratamiento mecánico o físico se realiza en un procesamiento por lote que utiliza un sistema de hidrolizador de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura tal como se han definido anteriormente, por
60 ejemplo, un Sunds Hydrolyzer disponible de Sunds Defibrator, aB Suecia. Los pretratamientos físicos y químicos puede llevarse a cabo consecutivamente o simultáneamente, como se desee.

[0204] Por consiguiente, el material celulósico o material que contiene xilano es preferiblemente sometido a pretratamiento (mecánico) físico o químico, o cualquier combinación de los mismos, para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

[0205] Pretratamiento biológico: el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material celulósico o material que contiene xilano.

Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar aplicar microorganismos solubilizantes de lignina y/o enzimas (ver, por ejemplo, for example, 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).

[0206] Sacarificación. En la etapa de hidrólisis, también conocida como sacarificación, el material celulósico o material que contiene xilano, por ejemplo, pretratado, se hidroliza para descomponer celulosa y/o hemicelulosa en 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.

Las enzimas de las composiciones se pueden añadir simultáneamente o consecutivamente.

[0207] La hidrólisis enzimática es preferiblemente realizada en un ambiente acuoso adecuado en condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. En un aspecto, la hidrólisis es realizada en condiciones adecuadas para la actividad de la enzima(s), es decir, óptima para la enzima(s).

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

[0208] La sacarificación es generalmente realizada en los reactores de tanque agitado o fermentadores bajo pH, temperatura, y condiciones de mezcla controlados.

El tiempo de proceso adecuado, la temperatura y las condiciones de pH pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Por ejemplo, la sacarificación puede durar hasta 200 horas, pero es típicamente realizada durante preferiblemente aproximadamente de 12 a aproximadamente 120 horas, por ejemplo, de aproximadamente 16 a aproximadamente 72 horas o de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas.

La temperatura está preferiblemente en el rango de aproximadamente 25°C a aproximadamente 70°C, por ejemplo, de aproximadamente 30°C a aproximadamente 65°C, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C, o de aproximadamente 50°C a aproximadamente 55°C.

El pH está preferiblemente en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, por ejemplo, de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 5.5.

El contenido en sustancias secas está preferiblemente en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 % en peso, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 % en peso o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % en peso.

[0209] Las composiciones enzimáticas pueden comprender cualquier proteína útil en la degradación del material celulósico o material que contiene xilano.

[0210] La composición enzimática puede comprender o puede comprender además una o más (por ejemplo, varias) proteínas seleccionadas del grupo consistente en una celulasas, un polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasas, una esterasa, una expansina, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

En otro aspecto, la hemicelulasas es preferiblemente una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una esterasa de acetilmanano, una acetilxilano esterasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronil, una mananasa, una manosidasa, una xilanasas, y una xilosidasa.

En otro aspecto, la celulasas es preferiblemente una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

[0211] La composición enzimática puede comprender una o más (por ejemplo, varias) enzimas celulolíticas.

La composición enzimática puede comprender o comprender además una o más (por ejemplo, varias) enzimas hemicelulolíticas.

La composición enzimática puede comprender una o más (por ejemplo, varias) enzimas celulolíticas y una o más (por ejemplo, varias) enzimas hemicelulolíticas.

5 La composición enzimática puede comprender una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo de enzimas celulolíticas y enzimas hemicelulolíticas.

[0212] La composición enzimática puede comprender una esterasa de acetilmanano.

La composición enzimática puede comprender una acetilxilano esterasa.

10 La composición enzimática puede comprender una arabinanasa (por ejemplo, alfa-L-arabinanasa).

La composición enzimática puede comprender una arabinofuranosidasa (por ejemplo, alfa-L-arabinofuranosidasa).

La composición enzimática puede comprender una esterasa de ácido cumárico.

La composición enzimática puede comprender una feruloil esterasa.

15 La composición enzimática puede comprender una galactosidasa (por ejemplo, alfa-galactosidasa y/o beta-galactosidasa).

La composición enzimática puede comprender una glucuronidasa (por ejemplo, alfa-D-glucuronidasa).

La composición enzimática puede comprender una esterasa de glucuronoil.

La composición enzimática puede comprender una mananasa.

La composición enzimática puede comprender una manosidasa (por ejemplo, beta manosidasa).

20 La composición enzimática puede comprender una xilanasa.

Preferiblemente, la xilanasa es una xilanasa de familia 10.

La composición enzimática puede comprender una xilosidasa (por ejemplo, beta-xilosidasa).

[0213] La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa.

25 La composición enzimática puede comprender una celobiohidrolasa.

La composición enzimática puede comprender una beta-glucosidasa.

La composición enzimática puede comprender un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

30 La composición enzimática puede comprender una celobiohidrolasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

La composición enzimática puede comprender una beta-glucosidasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa y una celobiohidrolasa.

35 La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa y una beta-glucosidasa. La composición enzimática puede comprender una celobiohidrolasa y una beta-glucosidasa.

La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

40 La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

La composición enzimática puede comprender una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

45 La composición enzimática puede comprender una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

[0214] La composición enzimática puede comprender una esterasa.

La composición enzimática puede comprender una expansina.

La composición enzimática puede comprender una lacasa.

50 La composición enzimática puede comprender una enzima ligninolítica.

Preferiblemente, la enzima ligninolítica es un manganeso peroxidasa.

Preferiblemente, la enzima ligninolítica es una lignina peroxidasa.

Preferiblemente, la enzima ligninolítica es una enzima que produce H₂O₂.

La composición enzimática puede comprender una pectinasa.

55 La composición enzimática puede comprender una peroxidasa.

La composición enzimática puede comprender una proteasa.

La composición enzimática puede comprender una swollenina

60 [0215] En los procesos de la presente invención, la enzima(s) se puede añadir antes o durante la fermentación, por ejemplo, durante la sacarificación o durante o después de la propagación del microorganismo(s) de fermentación.

[0216] Uno o más (por ejemplo, varios) componentes de la composición enzimática pueden ser proteínas tipo salvaje, proteínas recombinantes, o una combinación de proteínas de tipo salvaje y proteínas recombinantes.

65 Por ejemplo, uno o más (por ejemplo, varios) componentes pueden ser proteínas nativas de una célula, que se usa como una célula huésped para expresar recombinantemente uno o más (por ejemplo, varios) otros componentes de la composición enzimática.

Uno o más (por ejemplo, varios) componentes de la composición enzimática se puede 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.

5 [0217] Las enzimas usadas en los procesos de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el 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.

10 La composición enzimática puede ser un polvo seco o granulado, un granulado no polvoriento, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida estabilizada.

Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizados añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o un ácido láctico u otro ácido orgánico según procesos establecidos.

15 [0218] 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 celulolíticas de componente, el material celulósico o material que contiene xilano, la concentración de material celulósico o material que contiene xilano, el pretratamiento(s) del material celulósico o material que contiene xilano, la temperatura, el tiempo, el pH, y la inclusión de organismo fermentador (por ejemplo, levadura para sacarificación simultánea y fermentación).

20 [0219] Una cantidad eficaz de enzima celulolítica o hemicelulolítica al material celulósico o material que contiene xilano puede ser de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 50 mg, por ejemplo, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 0.75 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0.75 a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 10 mg por g del material celulósico o material que contiene xilano.

30 [0220] Una cantidad eficaz de un polipéptido con actividad de xilanasas al material celulósico o material que contiene xilano puede ser de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50.0 mg, por ejemplo, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 mg, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 1.5 mg, de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1.25 mg, de aproximadamente 0.075 a aproximadamente 1.25 mg, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1.25 mg, de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 1.25 mg, o de aproximadamente 0.25 a aproximadamente 1.0 mg por g del material celulósico o material que contiene xilano.

35 [0221] Una cantidad eficaz de un polipéptido con actividad de xilanasas para enzima celulolítica o hemicelulolítica puede ser de aproximadamente 0.005 a aproximadamente 1.0 g, por ejemplo, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 g, de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 0.75 g, de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 0.5 g, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 g, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.25 g, o de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.2 g por g de enzima celulolítica o hemicelulolítica.

45 [0222] Los polipéptido con actividad enzimática celulolítica o actividad enzimática hemicelulolítica al igual que otras proteínas/polipéptidos útiles en la degradación del material celulósico o material que contiene xilano, por ejemplo, polipéptidos GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica (colectivamente de ahora en adelante "polipéptidos con actividad enzimática") se pueden derivar u obtener de cualquier origen adecuado, incluyendo origen bacteriano, fúngico, levadura, planta o mamífero.

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

60 [0223] Uno o más (por ejemplo, varios) componentes de la composición enzimática pueden ser un componente recombinante, es decir, producido por clonación de una secuencia de ADN que codifica del componente único y la célula subsecuente transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (ver, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244).

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

65 Las proteínas celulolíticas monocomponentes también pueden ser preparadas por la purificación de tal proteína de un caldo de fermentación.

[0224] Las enzimas celulolíticas (una o más (por ejemplo, varias)) pueden comprender una preparación enzimática celulolítica comercial.

Ejemplos de preparaciones enzimáticas celulolíticas comerciales adecuadas para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLIC™ CTec (Novozymes A/S), CELLIC™ CTec2 (Novozymes A/S), CELLUCLAST™ (Novozymes A/S), NOVOZYM™ 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.), FILTRASE® NL (DSM); METHAPLUS® S/L 100 (DSM). 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 cantidades efectivas de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5.0 % en peso de sólidos, por ejemplo, de aproximadamente 0.025 a aproximadamente 4.0 % en peso de sólidos o de aproximadamente 0.005 a aproximadamente 2.0 % en peso de sólidos.

[0225] Ejemplos de endoglucanasas bacterianas que se pueden usar en los procesos de la presente invención 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).

[0226] Ejemplos de endoglucanasas fúngicas que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, una endoglucanasa de *Trichoderma reesei* I (Penttila et al., 1986, gen 45: 253-263), endoglucanasa I de *Trichoderma reesei Cel7B* (GENBANK™ nº de registro M15665), endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* (Saloheimo, et al., 1988, Gene 63:11-22), endoglucanasa II de *Trichoderma reesei Cel5A* (GENBANK™ nº de registro M19373), endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* (Okada et al., 1988, Appl. Circundar. Microbiol. 64: 555-563, GENBANK™ nº de registro), endoglucanasa V de *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 1994, Molecular Microbiology 13: 219-228, GENBANK™ nº de registro Z33381), endoglucanasa de *Aspergillus aculeatus* (Ooi et al., 1990, Nucleic Acids Research 18: 5884), endoglucanasa de *Aspergillus kawachii* (Sakamoto et al., 1995, Current Genetics 27: 435-439), endoglucanasa de *Erwinia carotovora* (Saarilahti et al., 1990, Gene 90: 9-14), endoglucanasa de *Fusarium oxysporum* (GENBANK™ nº de registro L29381), *Humicola grisea* var. *Teramoidea* endoglucanasa (GENBANK™ nº de registro AB003107), *Melanocarpus albomyces* endoglucanasa (GENBANK™ nº de registro MAL515703), endoglucanasa de *Neurospora crassa* (GENBANK™ nº de registro XM 324477), endoglucanasa V de *Humicola insolens*, endoglucanasa de *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, endoglucanasa de basidiomiceto CBS 495.95, endoglucanasa de basidiomiceto CBS 494.95, endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6B, endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6C, endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7C, endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7E, endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7F, endoglucanasa de *Cladorrhinum foecundissimum* ATCC 62373 CEL7A, y endoglucanasa de cepa de *Trichoderma reesei* nº VTT-D-80133 (GENBANK™ nº de registro M15665).

[0227] Los ejemplos de celobiohidrolasas útil en la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, celobiohidrolasa II de *Aspergillus aculeatus* (WO 2011/059740), celobiohidrolasa I de *thermophilum Chaetomium*, celobiohidrolasa II de *Chaetomium thermophilum*, celobiohidrolasa I de *Humicola insolens*, celobiohidrolasa II de *Myceliophthora thermophila* (WO 2009/042871), celobiohidrolasa II *Thielavia hircanie* (WO 2010/141325), celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A, WO 2006/074435), celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, y *Trichophaea saccata* celobiohidrolasa II (WO 2010/057086).

[0228] Los ejemplos de beta-glucosidasas útil en la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, beta-glucosidasas de *Aspergillus aculeatus* (Kawaguchi et al., 1996, gen 173: 287-288), *Aspergillus fumigatus* (WO 2005/047499), *Aspergillus niger* (Dan et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 4973-4980), *Aspergillus oryzae* (WO 02/095014), *Penicillium brasilianum* IBT 20888 (WO 2007/019442 y WO 2010/088387), *Thielavia terrestris* (WO 2011/035029), y *Trichophaea saccata* (WO 2007/019442).

[0229] La beta-glucosidasa puede ser una proteína de fusión.

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

[0230] Otras endoglucanasas útiles, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas se describen en numerosas familias de hidrolasa de glicosil que utilizan la clasificación según Henrissat, 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat and Bairoch, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0231] Otras enzimas celulolíticas que se pueden usar en la presente invención son descritas en WO 98/13465, WO 98/15619, WO 98/15633, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/25847, WO 99/31255, WO 02/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, patente US nº 5,457,046, patente US nº 5,648,263, y patente US nº 5,686, 593.

[0232] En los procesos de la presente invención, se puede usar cualquier polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica.

[0233] Los ejemplos de polipéptidos GH61 útiles que tienen actividad de mejora celulolítica en los procesos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, los polipéptidos GH61 de *Thielavia terrestris* (WO 2005/074647, WO 2008/148131, y WO 2011/035027), *Thermoascus aurantiacus* (WO 2005/074656 y WO 2010/065830), *Trichoderma reesei* (WO 2007/089290), *Myceliophthora thermophila* (WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868), *Aspergillus fumigatus* (WO 2010/138754), polipéptidos GH61 de *Penicillium pinophilum* (WO 2011/005867), *Thermoascus* sp. (WO 2011/039319), *Penicillium* sp. (WO 2011/041397), y *Thermoascus crustaceus* (WO 2011/041504).

[0234] En un aspecto, el polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica se usa en la presencia de un catión metálico bivalente de activación soluble según WO 2008/151043, por ejemplo, sulfato de manganeso.

[0235] En un aspecto, el polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica se usa en presencia de un dioxo compuesto, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto con nitrógeno, un compuesto de quinona, un compuesto con sulfuro, o una solución obtenida de un material celulósico pretratado o material que contiene xilano tal como rastrojos de maíz pretratados (PCS).

[0236] El compuesto dioxo puede incluir cualquier compuesto adecuado con dos o más átomos de oxígeno. En algunos aspectos, el compuesto dioxo contiene una fracción de arilo sustituido como se describe en este caso. Los compuestos dioxo pueden comprender uno o más (por ejemplo, varios) derivados hidroxilo y/o hidroxilo, pero también incluye fracciones de arilo sustituido sin hidroxilo y derivados hidroxilo.

Los ejemplos no limitativos de los compuestos dioxo incluyen pirocatecol o catecol; ácido cafeico; ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 4-terc-butil-5-metoxi-1,2-bencenediol; pirogalol; ácido gálico; metil-3,4,5-trihidroxibenzoato; 2,3,4-trihidroxibenzofenona; 2,6-dimetoxifenol; ácido sinapínico; ácido 3,5-dihidroxibenzoico; 4-cloro-1,2-benzenediol; 4-nitro-1,2-benzenediol; ácido tánico; galato etilo; glicolato de metilo; ácido dihidroxifumárico; 2-butino-1,4-diol; (ácido crocónico; 1,3-propanodiol; ácido tartárico; 2,4-pentanediol; 3-etioxi-1,2-propanodiol; 2,4,4'-trihidroxibenzofenona; cis-2-buteno-1,4-diol; 3,4-dihidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona; dihidroxiacetona; acroleína acetálica; metil-4-hidroxibenzoato; ácido 4-hidroxibenzoico; y metil-3; o una sal o solvato de los mismos.

[0237] El compuesto bicíclico puede incluir cualquier sistema anular fusionado sustituido adecuado como se describe en este caso.

Los compuestos pueden comprender uno o más (por ejemplo, varios) anillos adicionales, y no se limitan a un número específico de anillos a menos que se declare de otro modo.

En un aspecto, el compuesto bicíclico es un flavonoide.

En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un isoflavonoide opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un ión de flavilio opcionalmente sustituido, tal como una antocianidina opcionalmente sustituida o antocianina opcionalmente sustituida, o derivados.

Los ejemplos no limitativos de los compuestos bicíclicos incluyen epicatequina; quercetina; miricetina; taxifolina; kaempferol; morina; acacetina; naringenina; isoramnetina; apigenina; cianidina; cianina; kuromanina; keracianina; o una sal o solvato de las mismas.

[0238] El compuesto heterocíclico puede ser cualquier compuesto adecuado, tal como un anillo aromático o no-aromático opcionalmente sustituido que comprende un heteroátomo, como se describe en este caso.

En un aspecto, el heterocíclico es un compuesto que incluye una fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o una fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido es un heterocicloalquilo opcionalmente sustituido de cinco miembros o una fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido de cinco miembros.

En otro aspecto, el heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido es una fracción opcionalmente sustituida seleccionada de pirazolilo, furanilo, imidazolilo, isoxazolil, oxadiazolilo, oxazolilo, pirrolil, piridilo, pirimidil, piridazinil, tiazolilo, triazolilo, tienilo, dihidrotieno-pirazolilo, tianftenilo, carbazolilo, benzimidazolilo, benzotienil, benzofuranilo, indolil, quinoleínico, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, benzimidazolilo, isoquinoleínico, isoindolil, acridinilo, benzoisazolilo, dimetilhidantoína, pirazinilo, tetrahydrofuranilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, morfino, indolil, diazepinilo, azepinilo, tiepinilo, piperidinil, y oxepinilo.

En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido es un furanilo opcionalmente sustituido.

Los ejemplos no limitativos de los compuestos heterocíclicos incluyen (1,2-dihidroxyethyl)-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-ona; 4-hidroxi-5-metil-3-furanona; 5-hidroxi-2(5H)-furanona; [1,2-dihydroxyethyl]furan-2,3,4(5H)-triona; α -hidroxi- γ -butirolactona; ribónico γ -lactona; ácido aldohexuronicaldohexurónico γ -lactona; ácido glucónico δ -lactona; 4-hidroxycumarina; dihidrobenzofurano; 5-(hidroximetil)furfural; furoin; 2(5H)-furanona; 5,6-dihidro-2H-piran-2-ona; y 5,6-dihidro-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona; o una sal o solvato de los mismos.

[0239] El compuesto con nitrógeno puede ser cualquier compuesto adecuado con uno o más átomos de nitrógeno.

En un aspecto, el compuesto con nitrógeno comprende una fracción de amina, imina, hidroxilamina, o nitrógeno.

Los ejemplos no limitativos de los compuestos con nitrógeno incluyen oxima de acetona; ácido violúrico; piridina-2-aldoxima; 2-aminofenol; 1,2-bencenodiamina; 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi; 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina; 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropterina; y ácido maleámico; o una sal o solvato de los mismos.

[0240] El compuesto de quinona puede ser cualquier compuesto adecuado que comprende una fracción de quinona como se describe en este caso.

Los ejemplos no limitativos de los compuestos de quinona incluyen 1,4-benzoquinona; 1,4-naftoquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona o coenzima Q₀, 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzoquinona o duroquinone; 1,4-dihidroxiantraquinona; 3-hidroxi-1-metil-5,6-indolinediona o adrenocromo; 4-tert-butil-5-metoxi-1,2-benzoquinona; quinona de pirroloquinolina; o una sal o solvato de los mismos.

[0241] El compuesto con sulfuro puede ser cualquier compuesto adecuado que comprenda uno o más átomos de azufre.

El compuesto con sulfuro puede comprender una fracción seleccionada de tionilo, tioéter, sulfinilo, sulfonil, sulfamida, sulfonamida, ácido sulfónico, y éster sulfónico.

Ejemplos no limitativos de los compuestos con sulfuro incluyen etanotiol; 2-propanetiol; 2-propene-1-tiol; ácido 2-mercaptoetanosulfónico; bencenotiol; benzene-1,2-ditioil; cisteína; metionina; glutatión; cistina; o una sal o solvato de los mismos.

[0242] Una cantidad eficaz de tal compuesto anteriormente descrito a material celulósico o material que contiene xilano como una proporción molar para unidades glucosilicas de celulosa puede ser aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10, por ejemplo, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 7.5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 2.5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 1, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 1, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-1} , aproximadamente 10^{-4} a aproximadamente 10^{-1} , aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-1} , o aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-2} .

Una cantidad eficaz de tal compuesto anteriormente descrito puede ser aproximadamente 0.1 μ M a aproximadamente 1 M, por ejemplo, aproximadamente 0.5 μ M a aproximadamente 0.75 M, aproximadamente 0.75 μ M a aproximadamente 0.5 M, aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 0.25 M, aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 0.1 M, aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 5 mM, o aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 1 mM.

[0243] El término "solución" significa la fase soluble, bien acuosa, orgánica o una combinación, que surge de tratamiento de una lignocelulosa y/o material de hemicelulosa en un compuesto acuoso, o monosacáridos de los mismos, por ejemplo, xilosa, arabinosa, manosa, etc., en condiciones como se describen en este caso, y el contenido soluble de las mismas.

Una solución para la mejora celulolítica de un polipéptido GH61 se puede producir tratando una lignocelulosa o material de hemicelulosa (o materia prima) aplicando calor y/o presión, opcionalmente en presencia de un catalizador, por ejemplo, ácido, opcionalmente en presencia de un solvente orgánico, y opcionalmente en combinación con interrupción física del material, y luego separando la solución de los sólidos residuales.

Tales condiciones deciden el grado de mejora celulolítica obtenible a través de la combinación de solución y un polipéptido GH61 durante la hidrólisis de un sustrato celulósico por una preparación con celulasa.

La solución se puede separar del material tratado usando un método estándar en la técnica, tal como filtración, sedimentación, o centrifugación.

[0244] Una cantidad eficaz de la solución para celulosa puede ser aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10 g por g de celulosa, por ejemplo, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 7.5 g, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 2.5 g, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 1 g, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 1 g, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-1} g, aproximadamente 10^{-4} a aproximadamente 10^{-1} g, aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-1} g, o aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-2} g por g de celulosa.

[0245] Las enzimas hemicelulolíticas (una o más (por ejemplo, varias) pueden comprender una preparación enzimática hemicelulolítica comercial.

Los 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), MULTIFECT® Xylanase (Genencor), ACCELLERASE® XY (Genencor), ACCELLERASE® XC (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 Xylanase (DSM), DEPOL™ 333P (Biocatalysts Limit, Wales, UK), DEPOL™ 740L (Biocatalysts Limit, Gales, UK), y DEPOL™ 762P (Biocatalysts Limit, Gales, UK).

[0246] Los ejemplos de xilanasas adicionales útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP:AAR63790 WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* (WO

2006/078256), *Penicillium pinophilum* (WO 2011/041405), *Penicillium* sp. (WO 2010/126772), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/079210), y *Trichophaea saccata* GH10 (WO 2011/057083).

5 [0247] Los ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, beta-xilosidasas de *Neurospora crassa* (SwissProt número de registro Q7SOW4), *Trichoderma reesei* (UniProtKB/TrEMBL número de registro Q92458), y *Talaromyces emersonii* (SwissProt número de registro Q8X212).

10 [0248] Los ejemplos de acetilxilano esterasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, acetilxilano esterasas de *Aspergillus aculeatus* (WO 2010/108918), *Chaetomium globosum* (número de registro de Uniprot Q2GWX4), *Chaetomium gracile* (número de registro de GeneSeqP AAB82124), *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/073709), *Hipocrea jecorina* (WO 2005/001036), *Myceliophthora thermophila* (WO 2010/014880), *Neurospora crassa* (número de registro de UniProt q7s259), *Phaeosphaeria nodorum* (Uniprot número de registro QOUHJ1), y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/042846).

15 [0249] Los ejemplos de feruloilo esterasas (esterasas de ácido ferúlico) útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, formas de feruloilo esterasas de *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/076122), *Neosartorya fischeri* (UniProt número de registro A1 D9T4), *Neurospora crassa* (número de registro de UniProt Q9HGR3), *Penicillium aurantiogriseum* (WO 2009/127729), y *Thielavia terrestris* (WO 2010/053838 y WO 2010/065448).

20 [0250] Los ejemplos de arabinofuranosidasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, arabinofuranosidasas de *Aspergillus niger* (GeneSeqP número de registro de AAR94170), *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2006/114094 y WO 2009/073383), y *M. giganteus* (WO 2006/114094).

25 [0251] Los ejemplos de alfa-glucuronidasas útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, alfa-glucuronidasas de *Aspergillus clavatus* (UniProt número de registro alcc12), *Aspergillus fumigatus* (SwissProt número de registro Q4WW45), *Aspergillus niger* (número de registro de Uniprot Q96WX9), *Aspergillus terreus* (SwissProt número de registro QOCJP9), *Humicola insolens* (WO 2010/014706), *Penicillium aurantiogriseum* (WO 2009/068565), *Talaromyces emersonii* (UniProt número de registro Q8X211), y *Trichoderma reesei* (Uniprot número de registro Q99024).

35 [0252] Los polipéptido con actividad enzimática usada en los procesos de la presente invención se pueden producir por fermentación de las cepas microbianas mencionadas anteriormente en un medio nutritivo que contiene fuentes de nitrógeno y carbono adecuadas y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Bennett, J.W. and LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Los rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y la 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).

45 [0253] La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula dando como resultado la expresión o aislamiento de una enzima o proteína. La fermentación puede, por lo tanto, ser entendida como que comprende un cultivo en un matraz de agitación, o fermentación a grande o pequeña escala (incluyendo fermentaciones de lote, continuas, lote alimentado, o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y en condiciones patra permitir expresar o aislar la enzima. Las enzimas resultantes producidas por los métodos anteriormente descritos se pueden recuperar del medio de fermentación y purificar por procedimientos convencionales.

50 [0254] Fermentación. Los azúcares fermentables obtenidos del material celulósico hidrolizado o material que contiene xilano se pueden fermentar por uno o más (por ejemplo, varios) microorganismos fermentadores capaces de fermentar 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 comprende un paso de fermentación. Los 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 deseada y organismo fermentador y pueden fácilmente ser determinadas por un experto en la técnica.

60 [0255] En la etapa de fermentación, los azúcares, liberados del material celulósico o material que contiene xilano como resultado del pretratamiento y pasos de hidrólisis enzimática, se fermentan a un producto, por ejemplo, etanol, por un organismo fermentador, tal como levadura. 65 Hidrólisis (sacarificación) y fermentación pueden ser separadas o simultáneas, como se describe en este caso.

[0256] Cualquier material celulósico hidrolizado adecuado o material que contiene xilano se puede usar en el paso de fermentación al practicar la presente invención.

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

5 [0257] El término "medio de fermentación" se entiende aquí como un medio antes de que se añada el microorganismo(s) de fermentación, tal como un medio resultante de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en una sacarificación y proceso de fermentación (SSF) simultáneos.

10 [0258] "Microorganismos de fermentación" se refiere a cualquier microorganismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuado para usar en un proceso de fermentación deseado para producir un producto de fermentación.

El organismo fermentador puede ser organismos fermentadores de hexosa y/o pentosa, o una combinación de los mismos.

15 Tanto organismos fermentadores de hexosa como de pentosa se conocen en la técnica. Los microorganismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, maltosa, manosa, galactosa, y/o oligosacáridos, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

20 Los ejemplos de organismos fermentadores bacterianos y fúngicos que producen etanol son descritos por Lin et al., 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

[0259] Los ejemplos de microorganismos fermentadores que pueden fermentar azúcares de hexosa incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tales como levadura.

25 La levadura preferida incluye cepas de *Candida*, *Kluyveromyces*, y *Saccharomyces*, por ejemplo, *Candida sonorensis*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Saccharomyces cerevisiae*.

[0260] Los ejemplos de organismos fermentadores que pueden fermentar azúcares de pentosa en su estado nativo incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tales como alguna levadura.

30 La levadura fermentadora de xilosa preferida incluye cepas de *Candida*, preferiblemente *C. sheatae* o *C. sonorensis*; y cepas de *Pichia*, preferiblemente *P. stipitis*, tales como *P. stipitis* CBS 5773.

La levadura fermentadora de pentosa preferida incluye cepas de *Pachysolen*, preferiblemente *P. tannophilus*.

Los organismos no capaces de fermentar azúcares de pentosa, tales como xilosa y arabinosa, pueden ser genéticamente modificados para hacerlo por métodos conocidos en la técnica.

35 [0261] Los ejemplos de bacterias que pueden fermentar hexosa y pentosa eficazmente a etanol incluyen, por ejemplo, *Bacillus coagulans*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium phytofermentans*, *Geobacillus* sp., *Thermoanaerobacter saccharoliticum*, y *Zymomonas mobilis* (Philippidis, 1996, supra).

40 [0262] Otros organismos fermentadores incluyen cepas de *Bacillus*, tales como cepas de *Bacillus coagulans*; *Candida*, such as *C. sonorensis*, *C. methanosorbosa*, *C. diddensiae*, *C. parapsilosis*, *C. naedodendra*, *C. blankii*, *C. entomophilia*, *C. brassicae*, *C. pseudotropicalis*, *C. boidinii*, *C. utilis*, y *C. scephatae*; *Clostridium*, tales como *C. acetobutylicum*, *C. thermocellum*, y *C. phytofermentans*; *E. coli*, especialmente cepas de *E. coli* que se han modificado genéticamente para mejorar el rendimiento de etanol; *Geobacillus* sp.; *Hansenula*, tales como *Hansenula anomala*; *Klebsiella*, tales como *K. oxytoca*; *Kluyveromyces*, tales como *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, y *K. fragilis*; *Schizosaccharomyces*, tales como *S. pombe*; *Thermoanaerobacter*, tales como *Thermoanaerobacter saccharoliticum*; y *Zymomonas*, tales como *Zymomonas mobilis*.

[0263] Preferiblemente, la levadura es una *Bretannomyces*.

Preferiblemente, la levadura es *Bretannomyces clausenii*.

50 En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida sonorensis*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida boidinii*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida blankii*.

55 Más preferiblemente, la levadura es *Candida brassicae*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida diddensii*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida entomophillia*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida pseudotropicalis*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida scephatae*.

Más preferiblemente, la levadura es *Candida utilis*.

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

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

Más preferiblemente, la levadura es *Clavispora opuntiae*.

Preferiblemente, la levadura es una *Kluyveromyces*.

Más preferiblemente, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*.

65 Más preferiblemente, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*.

Más preferiblemente, la levadura es *Kluyveromyces thermotolerans*.

Más preferiblemente, la levadura es una *Pachysolen*.
 Más preferiblemente, la levadura es *Pachysolen tannophilus*.
 Más preferiblemente, la levadura es una *Pichia*.
 Más preferiblemente, la levadura es una *Pichia stipitis*.
 5 Más preferiblemente, la levadura es una *Saccharomyce* spp.
 Más preferiblemente, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
 Más preferiblemente, la levadura es *Saccharomyces distaticus*.
 En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces uvarum*.

10 [0264] Preferiblemente, la bacteria es un *Bacillus*.
 Más preferiblemente, la bacteria es *Bacillus coagulans*.
 Preferiblemente, la bacteria es un *Clostridium*.
 Preferiblemente, la bacteria es *Clostridium acetobutylicum*.
 Más preferiblemente, la bacteria es *Clostridium phytofermentans*.
 15 Más preferiblemente, la bacteria es *Clostridium thermocellum*.
 Más preferiblemente, la bacteria es *Geobacillus* sp.
 Más preferiblemente, la bacteria es un *Thermoanaerobacter*.
 Más preferiblemente, la bacteria es *Thermoanaerobactersaccharolyticum*.
 20 Preferiblemente, la bacteria es un *Zymomonas*.
 Más preferiblemente, la bacteria es *Zymomonas mobilis*.

[0265] Las levaduras disponibles comercialmente adecuadas para la producción de etanol incluyen, por ejemplo, BBIOFERM™ AFT y XR (NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU.), levadura ETHANOL RED (Fermentis/Lesaffre; EE.UU.), FALI™ (Fleischmann's Yeast, EE.UU.), FERMIOL™ (DSM Specialties), GERT STRAND™ (Gert Strand AB, Suecia), y SUPERSTART™ y levadura fresca de THERMOSACC™ (Ethanol Technology, WI, USA).
 25

[0266] Preferiblemente, el microorganismo fermentador ha sido genéticamente modificado para proporcionar la capacidad de fermentar azúcares de pentosa, tales como microorganismos que utilizan xilosa, arabinosa, y que co-
 30 utilizan xilosa y arabinosa.

[0267] La clonación de los genes heterólogos en varios microorganismos fermentadores ha llevado a la construcción de organismos capaces de convertir hexosas y pentosas a etanol (co-fermentación) (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
 35 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;
 40 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).
 45

[0268] Preferiblemente, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Candida sonorensis*.
 Preferiblemente, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Escherichia coli*.
 50 Preferiblemente, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Klebsiella oxytoca*.
 Más preferiblemente, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Kluyveromyces marxianus*.
 Preferiblemente, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Saccharomyces cerevisiae*.
 Más preferiblemente, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Zymomonas mobilis*.

55 [0269] Es bien conocido en la técnica que los organismos anteriormente descritos también pueden usarse para producir otras sustancias, como se describe en este caso.

[0270] El microorganismo fermentador es típicamente añadido al material celulósico degradado o material que contiene xilano o hidrolizado y la fermentación se realiza durante de aproximadamente 8 a aproximadamente 96
 60 horas, por ejemplo, de aproximadamente 24 a aproximadamente 60 horas.
 La temperatura es típicamente de entre aproximadamente 26°C a aproximadamente 60°C, por ejemplo, de aproximadamente 32°C o 50°C, y alrededor de pH 3 para a alrededor de pH 8, por ejemplo, pH 4-5, 6, o 7.

[0271] La levadura y/o otro microorganismo se puede aplicar el material celulósico degradado o material que contiene xilano y la fermentación se realiza durante de aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, tal como típicamente 24-60 horas.
 65

La temperatura puede preferiblemente estar entre de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, por ejemplo, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 50°C, de aproximadamente 32°C a aproximadamente 50°C, o de aproximadamente 32°C a aproximadamente 50°C, y el pH está generalmente de alrededor de pH 3 a alrededor de pH 7, por ejemplo, alrededor de pH 4 a acerca de pH 7.

5 Sin embargo, algunos organismos fermentadores, por ejemplo, bacterias, tienen temperatura de fermentación óptima más alta.

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

10 Orientaciones adicionales con respecto a usar levadura para la fermentación se pueden encontrar en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999).

[0272] Para producir etanol, después de la fermentación el compuesto acuoso fermentado se destila para extraer el etanol.

15 El etanol obtenido según los procesos de la invención se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables, o etanol industrial.

[0273] Un estimulador de fermentación se puede usar en combinación con cualquiera de los procesos descritos aquí para mejorar adicionalmente un proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como, mejora de índice y rendimiento de etanol.

20 Un "estimulador de fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentadores, en particular, la levadura.

Estimuladores de fermentación preferidos para crecimiento incluyen vitaminas y minerales.

25 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)

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

[0274] Productos de fermentación: un producto de fermentación puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación.

35 El producto de fermentación puede ser, sin limitación, un alcohol (por ejemplo, arabinol, n-butanol, isobutanol, etanol, glicerol, metanol, etilenglicol, 1,3-propanodiol [propilenglicol], butanodiol, glicerina, sorbitol, y xilitol); un alcano (por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano, y dodecano), un cicloalcano (por ejemplo, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, y ciclooctano), un alqueno (por ejemplo penteno, hexeno, hepteno, y octeno); un aminoácido (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); un gas (por ejemplo, metano, hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2), y monóxido de carbono (CO)); isopreno; una cetona (por ejemplo, acetona); 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); y policétido.

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

45 [0275] Preferiblemente, el producto de fermentación es un alcohol.

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

Más preferiblemente, el alcohol es n-butanol.

Más preferiblemente, el alcohol es isobutanol.

50 Más preferiblemente, el alcohol es etanol.

Más preferiblemente, el alcohol es metanol.

Más preferiblemente, el alcohol es arabinol.

Más preferiblemente, el alcohol es butanodiol.

Más preferiblemente, el alcohol es etilenglicol.

55 En otro aspecto más preferido, el alcohol es glicerina.

Más preferiblemente, el alcohol es glicerol.

Más preferiblemente, el alcohol es 1,3-propanodiol. Más preferiblemente, el alcohol es sorbitol. Más preferiblemente, el alcohol es xilitol.

60 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 and Singh, 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30(2): 117-124; Ezeji et al., 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.

65

- [0276] Preferiblemente, el producto de fermentación es un alcano.
El alcano puede ser un no ramificado o un alcano ramificado.
Más preferiblemente, el alcano es pentano.
5 Más preferiblemente, el alcano es hexano. Más preferiblemente, el alcano es heptano. Más preferiblemente, el alcano es octano.
Más preferiblemente, el alcano es nonano.
Más preferiblemente, el alcano es decano.
Más preferiblemente, el alcano es undecano.
10 Más preferiblemente, el alcano es dodecano.
- [0277] Preferiblemente, el producto de fermentación es un cicloalcano.
Más preferiblemente, el cicloalcano es ciclopentano.
Más preferiblemente, el cicloalcano es ciclohexano.
15 Más preferiblemente, el cicloalcano es cicloheptano.
Más preferiblemente, el cicloalcano es ciclooctano.
- [0278] Preferiblemente, el producto de fermentación es un alqueno.
El alqueno puede ser un no ramificado o un alqueno ramificado.
20 Más preferiblemente, el alqueno es penteno.
Más preferiblemente, el alqueno es hexeno.
Más preferiblemente, el alqueno es hepteno.
Más preferiblemente, el alqueno es octeno.
- [0279] Más preferiblemente, el producto de fermentación es un aminoácido.
25 Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido aspártico.
Más preferiblemente, el aminoácido es ácido glutámico.
Más preferiblemente, el aminoácido es glicina.
Más preferiblemente, el aminoácido es lisina.
30 Más preferiblemente, el aminoácido es serina.
Más preferiblemente, el aminoácido es treonina.
Ver, por ejemplo, Ricardo and Margaritis, 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering* 87(4): 501-515.
- [0280] Preferiblemente, el producto de fermentación es un gas.
35 Más preferiblemente, el gas es metano.
Más preferiblemente, el gas es H₂.
Más preferiblemente, el gas es CO₂.
Más preferiblemente, el gas es CO.
40 Ver, por ejemplo, Kataoka et al., 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, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review, *Biomass and Bioenergy*. 13(1-2): 83-114.
- [0281] Preferiblemente, el producto de fermentación es isopreno.
- 45 [0282] Preferiblemente, el producto de fermentación es una cetona.
Se entiende que el término "cetona" abarca una sustancia que contiene una o varias fracciones de cetona.
Más preferiblemente, la cetona es acetona.
Ver, por ejemplo, Qureshi and Blaschek, 2003, *supra*.
- 50 [0283] Preferiblemente, el producto de fermentación es un ácido orgánico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido acético.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido acetónico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido adípico.
55 Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido ascórbico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido cítrico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido 2,5-diceto-D-glucónico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido fórmico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido fumárico.
60 Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido glucárico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido glucónico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido glucurónico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido glutárico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido 3-hidroxipropiónico.
65 Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido itacónico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido láctico.
Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido málico.

Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido malónico.

Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido oxálico.

Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido propiónico.

Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido succínico.

5 Más preferiblemente, el ácido orgánico es ácido xilónico.

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

[0284] Preferiblemente, el producto de fermentación es policétido.

10 [0285] Recuperación. El producto(s) de fermentación puede ser opcionalmente recuperado del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación, o extracción.

15 Por ejemplo, el alcohol es separado del material celulósico fermentado o material que contiene xilano y purificado por métodos convencionales de destilación.

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

20 [0286] La presente invención es posteriormente descrita por los ejemplos siguientes que no deberán ser interpretados como limitadores del ámbito de la invención.

Ejemplos

Cepas

25 [0287] La cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 fue usada como fuente de un polipéptido con actividad de xilanasa.

Cepa de *Aspergillus oryzae* MT3568 fue usada para la expresión del gen de *Talaromyces leycettanus* que codifica el polipéptido con actividad de xilanasa.

30 *A. oryzae* MT3568 es un gen alterado de *amdS* (acetamidasa) derivado de *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 02/40694) donde auxotrofia *pyrG* fue restaurada por la interrupción de la acetamidasa del gen de *A. oryzae* (*amdS*).

Medios y soluciones

35 [0288] Medio de glucosa YP+2% fue compuesto por 1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa.

[0289] Las placas de agar PDA fueron compuestas de infusión de patata (la infusión de patata fue hecha por de ebullición de 300 g de rodajas de patata (lavadas pero no peladas) en agua durante 30 minutos y luego decantando o colando el caldo a través de una estopilla.

40 Luego se añadió agua destilada hasta que el volumen total de la suspensión fue un litro, seguido de 20 g de dextrosa y 20 g de polvo de agar.

El medio fue esterilizado por autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998).

45 [0290] Las placas LB fueron compuestas de 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro sódico, 15 g de Bacto-agar, y agua desionizada hasta 1 litro.

El medio fue esterilizado por la autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998).

50 [0291] Las placas de sacarosa de COVE fueron compuestas de 342 g sacarosa (Sigma S-9378), 20 g polvo de Agar, 20 ml solución salina de COVE (26 g MgSO₄.7H₂O 26 g KCL, 26 g KH₂PO₄, 50 ml solución de metal traza de COVE) y agua desionizada hasta 1 litro), y agua desionizada hasta 1 litro).

El medio fue esterilizado por la autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998).

55 El medio fue enfriado a 60°C y se añadieron 10 mM acetamida, 15 mM CsCl, Tritón X-100 (50 µl/500 ml).

[0292] La solución de metal traza de COVE fue compuesta por 0.04 g Na₂B₄O₇.10H₂O, 0.4 g CuSO₄.5H₂O, 1.2 g FeSO₄.7H₂O, 0.7 g MnSO₄.H₂O, 0.8 g Na₂MoO₄.2H₂O, 10 g ZnSO₄.7H₂O, y agua desionizada a 1 litro.

60 [0293] El medio Dap-4C fue compuesto por 20 g dextrosa, 10 g maltosa, 11 g MgSO₄.7H₂O, 1 g KH₂PO₄, 2g de ácido cítrico, 5.2 g K₃PO₄.H₂O, 0.5 g extracto de levadura (Difco), 1 ml Dowfax 63N10 (compañía de química de Dow), 0.5 ml solución de metales traza KU₆, 2.5 g CaCO₃, y agua desionizada a 1 litro.

El medio fue esterilizado por autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998).

65 Antes de usarlo, se añadieron 3.5 ml de (NH₄)₂HPO₄ estéril 50 % y 5 ml de ácido láctico estéril 20 % al medio Dap-4C por 150 ml de medio.

[0294] La solución de metales traza KU6 fue compuesta por 0.13 g de NiCl₂, 2.5 g de CuSO₄·5H₂O, 13.9 g de FeSO₄·7H₂O, 8.45 g de MnSO₄·H₂O, 6.8 g de ZnCl₂, 3g de ácido cítrico, y agua desionizada a 1 litro.

5 Ejemplo 1: fuente de información de secuencia de ADN para cepa CBS398.68 de *Talaromyces leycettanus*

[0295] La información de secuencia genómica fue generada por secuenciación Illumina DNA en el Beijing Genome Institute (BGI) en el Pekín (China) de ADN genómico aislado de cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68.

10 Un ensamblaje preliminar del genoma fue analizado utilizando el Pedant-Pro™ Sequence Analysis Suite (Biomax Informatics AG, Martinsried Alemania).

Modelos de gen construidos por el software fueron usados como punto de partida para la detección de GH10 homólogo en el genoma.

Modelos de gen más precisos fueron construidos manualmente usando múltiples secuencias de proteínas GH10 conocidas como una guía.

15

Ejemplo 2: Extracción de ADN genómico de cepa de CBS398.68 de *Talaromyces leycettanus*

[0296] Para generar ADN genómico para amplificación de PCR, la cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 fue propagada en placas de agar PDA mediante el cultivo a 26°C durante 7 días.

20 Esporas cosechadas de las placas PDA fueron usadas para inocular 25 ml de medio de glucosa YP+2% en un matraz de agitación disipado e incubadas a 26°C durante 72 horas con agitación a 85 r.p.m.

[0297] El ADN genómico fue aislado según un protocolo de equipo DNeasy Plant Maxi modificado (Qiagen Danmark, Copenhagen, Dinamarca).

25 El material fúngico del cultivo de arriba fue cosechado por centrifugación a 14,000 x g durante 2 minutos.

El sobrenadante fue quitado y los 0.5 g del granulado fueron congelados en el nitrógeno líquido con arena cuarzosa y triturado en un polvo fino en un mortero preenfriado.

El polvo fue transferido a un tubo centrífugo se15 ml y se le añadió 5 ml de tampón AP1 (precalentado a 65°C) y 10 µl de solución madre de ribonucleasa pancreática (100 mg/ml) seguido de una agitación en vórtex vigorosa.

30 Tras la incubación durante 10 minutos a 65°C con inversión regular del tubo, 1.8 ml tampón AP2 se añadió al lisado mezclándolo suavemente seguido de incubación en el hielo durante 10 min. El lisado fue luego centrifugado a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante fue decantado en una columna de rotación QIAshredder maxi colocada en un tubo de recogida de 50 ml.

Esto fue seguido de centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

35 El flujo pasante fue transferido a un nuevo tubo 50 ml y se le añadió 1.5 volúmenes de tampón AP3/E seguido de agitación en vórtex. 15 ml de la muestra fueron transferidos a una columna de rotación colocada DNeasy Maxi en un tubo 50 ml de recogida y centrifugada a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El flujo pasante fue descartado y 12 ml tampón AW se añadió a la columna de rotación DNeasy maxi colocada en un tubo 50 ml de recogida y centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

40 Después del descarte del flujo pasante, la centrifugación fue repetida para deshacerse del alcohol restante.

La columna DNeasy maxi de rotación fue transferida a un nuevo tubo 50 ml y 0.5 ml de tampón AE (precalentada a 70°C).

Tras la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue eludida por centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

45 La elución fue repetida con un tampón AE 0.5 ml adiconay los eluatos fueron combinados.

La concentración del ADN cosechado fue medida por un espectrofotómetro UV a 260 nm.

Ejemplo 3: Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene secuencia genómica de cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 que codifica un polipéptido de familia GH10 con actividad de xilanas

50

[0298] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados más abajo fueron diseñados para amplificar PCR el gen de la cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 P24F5Z (SEC ID n.º: 1) del ADN genómico preparado en el ejemplo 2.

Un equipo de clonación de IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA EE.UU.) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pDau109 (WO 2005/042735).

55

F-P24F5Z

5'- ACACAACTGGGGATCCACCATGGTCCATCTTTCTTCCCTGGCC -3' (SEC ID n.º: 7)

R-P24F5Z

5'- CCCTCTAGATCTCGAGTTACAGGCACTGGTAGTAGGGATTC -3' (SEC ID n.º: 8)

60

[0299] Letras en negrita representan secuencia de genes.

La secuencia subrayada es homóloga a los sitios de inserción de pDau109.

[0300] Un motor de ADN MJ Research PTC-200 DNA fue usado para realizar la reacción por PCR.

65 Un Phusion® High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) fue usado para la amplificación de PCR.

La reacción por PCR fue compuesta por 5 µl de tampón 5X HF (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de Polimerasa de DNA de phusion® (0.2 unidades/µl) (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 1 µl de cebador F-P24F5Z (5 µM), 1 µl de cebador R-P24F5Z (5 µM), 0.5 µl de ADN genómico de *Talaromyces leycettanus* (100 ng/µl), y 16.5 µl de agua desionizada en un volumen total de 25 µl.

5 Las condiciones RCP fueron 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos. 35 ciclos cada vez a 98°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C para 2.5 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.

La muestra fue luego mantenida a 12°C hasta retirarla de la máquina PCR.

10 [0301] Los productos reactivos fueron aislados por electroforesis en gel de agarosa 1.0% utilizando 40 mM Tris base, 20 mM acetato sódico, 1 mM tampón de EDTA (TAE) disodio donde una banda de producto de 1513 par de bases fue extirpada del gel y purificada utilizando un ilustra GFX® PCR DNA y Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Dinamarca) según las instrucciones del fabricante.

El fragmento fue luego clonado en *Bam* HI y pDau109 digerido *Xho* I utilizando un IN-FUSION™ Cloning Kit dando como resultado plásmido pP24F5Z.

15 Clonación del P24F5Z gen en pDau109 *Bam* HI-*Xho* I digerido resultó en la transcripción del gen de *Talaromyces leycettanus* P24F5Z bajo el control de un promotor doble NA2-tpi.

NA2-tpi es un promotor modificado del gen que codifica la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

20 [0302] El protocolo de clonación fue realizada según las instrucciones del IN-FUSION™ Cloning Kit que generan una construcción P24F5Z GH10.

El plásmido e inserto tratados fueron transformados en células de *E. coli* químicamente competentes One Shot® TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante y colocados en placas LB suplementadas con 0.1 mg de ampicilina por ml.

25 Tras la incubación a 37°C durante toda la noche, se vio que las colonias crecían bajo selección en las placas de ampicilina LB.

30 Cuatro colonias transformadas con la construcción P24F5Z GH10 fueron cultivadas en medio LB suplementado con 0.1 mg de ampicilina por ml y el plásmido fue aislado con un QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante.

[0303] Los plásmidos aislados fueron secuenciados con cebadores de vector y cebadores específicos del gen P24F5Z para determinar un clon de expresión de plásmido representativo que estuviera libre de errores de PCR.

35 Ejemplo 4: Caracterización de la secuencia genómica CBS398.68 de *Talaromyces leycettanus* que codifica un polipéptido P24F5Z GH10 con actividad de xilanasas

40 [0304] La secuenciación del ADN del clon genómico CBS398.68 P24F5Z GH10 de *Talaromyces leycettanus* fue realizada con un secuenciador Applied Biosystems Model 3700 Automated DNA Sequencer usando química de terminador de BIG-DYE™ versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA EE.UU.) y estrategia de paseo con cebador.

Los datos de secuencia de nucleótidos fueron escrutinados en cuestión de calidad y todas las secuencias fueron comparadas unas a la otras con asistencia de software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).

45 La secuencia obtenida fue idéntica a la secuencia del JGI.

[0305] La secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen P24F5Z de *Talaromyces leycettanus* se muestra en SEC ID n.º: 1 y SEC ID n.º: 2, respectivamente.

La secuencia codificante es 1268 par de bases incluyendo el codón de terminación y se interrumpe por un intrón.

50 La proteína predicha codificada es 364 aminoácidos.

Se predijo un péptido señal de 17 residuos usando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6).

La proteína madura predicha contiene 347 aminoácidos con una masa molecular predicha de 38.7 kDa y un pH isoelectrónico de 4.6.

55 [0306] Un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos fue determinado utilizando el algoritmo Needleman and Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) con penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5, y el matriz EBLOSUM62.

60 La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Talaromyces leycettanus* que codifica el polipéptido P24F5Z GH10 con actividad de xilanasas comparte un 75.6% de identidad (excluyendo espacios) a la secuencia de aminoácidos deducida de una familia de proteína GH10 predicha de *Penicillium canescens* (número de registro UNIPROT:C3VEV9) con actividad de xilanasas.

Ejemplo 5: Expresión de xilanasas P24F5Z GH10 de *Talaromyces leycettanus*

65

[0307] El plásmido de expresión pP24F5Z fue transformado en el *Aspergillus oryzae* MT3568.

El *Aspergillus oryzae* MT3568 es un derivado interrumpido de AMDS (acetamidasa) de JaL355 (WO 02/40694) donde auxotrofia *pyrG* fue restaurada en el proceso del quitar el gen acetamidasa de *A. oryzae* (AMDS). Los protoplastos MT3568 se preparan según el método de patente europea n° 0238023, páginas 14-15.

5 [0308] Los transformantes fueron purificados en placas de selección de sacarosa de COVE a través de conidias únicas antes de esporularlos en placas PDA.

La producción de polipéptido GH10 de *Talaromyces leycettanus* por los transformantes fue analizada de sobrenadantes de cultivo de 1 ml en 96 pocillos profundos de cultivos fijos a 30°C en medio de glucosa YP+2%.

10 La expresión fue verificada en un gel de pocillo E-Page 8% SDS-PAGE 48 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) por coloración de Coomassie.

Un transformante fue seleccionado para seguir trabajando y fue designado *Aspergillus oryzae* designado 41.4.3.

[0309] Para la producción a mayor escala, esporas de *Aspergillus oryzae* 41.4.3 fueron extendidas sobre una placa PDA e incubadas durante cinco días a 37°C.

15 La placa de esporas confluyente se lavó dos veces con 5 ml de 0.01% TWEEN® 20 para maximizar el número de esporas recogido.

La suspensión de esporas fue luego usada para inocular veinticinco matraces de 500 ml con 100 ml de medio Dap-4C.

El cultivo fue incubado a 30°C con agitación constante a 100 r.p.m.

20 Al cuarto día cuatro tras la inoculación, el caldo de cultivo fue recogido por filtración a través de un filtro de tapón de botellas MF75 Supor MachV 0.2 µm PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).

El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda de proteína GH10 de aproximadamente 50 kDa con embreación, lo que indica glicosilación posible.

25 La identidad de la banda prominente como el polipéptido GH10 de *Talaromyces leycettanus* fue verificada por secuenciación de péptido.

Ejemplo 6: Método alternativo para la producción de la xilanasa GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F5Z

30 [0310] Basado en la secuencia de nucleótidos identificada como SEC ID n.º: 1, un gen sintético puede ser obtenido de un número de vendedores tal como Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Alemania) o DNA 2.0 (DNA2.0, 1430 O'Brien Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, USA).

El gen sintético se puede diseñar para incorporar secuencias de ADN adicionales tales como sitios de restricción o regiones de recombinación homólogas para facilitar la clonación en un vector de expresión.

35 [0311] Usando los dos cebadores oligonucleótidos sintéticos F-P24F5Z y R-P24F5Z anteriormente descritos, una reacción por PCR simple puede utilizarse para amplificar el marco de lectura abierto en toda su longitud del gen sintético de SEC ID n.º: 1.

El gen puede después ser clonado en un vector de expresión por ejemplo como se ha descrito anteriormente y expresado en una célula huésped, por ejemplo en el *Aspergillus oryzae* como se ha descrito anteriormente.

40 Ejemplo 7: Purificación de la xilanasa GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F5Z

[0312] 1000 ml de caldo de la cepa de expresión de *Aspergillus oryzae* 41.4.3 fue ajustado a pH 7.0 y filtrado en 0.22 µm filtro PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).

45 Después, el filtrado fue añadido a 1.8 M de sulfato de amonio.

El filtrado fue cargado sobre una columna Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (high sub) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) (con un volumen de columna de 60 mL) equilibrada con 1.8 M de sulfato de amonio 7.0 pH, 25 mM HEPES pH 7.0.

50 Después de la aplicación, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado seguidos de 7 volúmenes de columna de 1.0 M sulfato de amonio (la proteína siguió uniéndose a la columna) y la proteína fue eluida después con 5 volúmenes de columna de 25 mM HEPES pH 7.0 a una velocidad de flujo de 15 ml/min.

Las fracciones de 10 mL fueron recogidas y analizadas por SDS-page.

Las fracciones fueron agrupadas y aplicadas a una columna equilibrada Sephadex™ G-25 (medio) (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, EE.UU.) en 25 mM HEPES pH 7.0.

55 Las fracciones fueron aplicadas a una columna equilibrada SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, EE.UU.) en 25 mM HEPES pH 7.0 (volumenes de columna 60 mL).

Después de la aplicación de la columna se lavó con 5 tampones de equilibrado de volúmenes de columna y las proteínas ligadas fueron eluidas con un gradiente lineal sobre 20 volúmenes de columna de 0-1000 mM cloruro sódico.

60 Las fracciones de 10 ml fueron recogidas y analizadas por SDS-page, y la fracciones con la proteína fueron agrupadas.

Con dos picos diferentes en el cromatograma, dos depósitos A y B fueron hechos.

La concentración de proteína fue determinada por absorbancia A280/A260.

65 La identidad de proteína fue verificada por MS/MS en la muestra digerida en gel que confirma la identidad de ambas fracciones.

Ejemplo 8: Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene secuencia genómica de cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 que codifica un polipéptido de familia GH10 con actividad de xilanasas

[0313] Los dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados debajo fueron diseñados para amplificar PCR la cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 P24F61 gen (SEC ID n.º: 3) del ADN genómico preparado en el ejemplo 2.

Un equipo de clonación IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU.) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pDau109 (WO 2005/042735).

F-P24F61

5'- ACACAACTGGGGATCC**ACCATGGTCCGCTCTTCCGCTGGA** -3' (SEC ID n.º: 9)

R-P24F61

5'- CCCTCTAGATCTCGAGTTACAAGCACTGGGAGTACCACTGG -3' (SEC ID n.º: 10)

[0314] Letras en negrita representan la secuencia de genes.

La secuencia subrayada es homóloga a los sitios de inserción de pDau109.

[0315] Un motor de MJ Research PTC-200 DNA fue usado para realizar la reacción por PCR.

Un equipo Phusion® High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) fue usado para la amplificación de PCR.

La reacción por PCR fue compuesta por 5 µl de tampón 5X HF (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de polimerasa de DNA de Phusion® (0.2 unidades/µl) (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 1 µl de cebador F-P24F61 (5 µM), 1 µl de cebador R-P24F61 (5 µM), 0.5 µl de ADN genómico de *Talaromyces leycettanus* (100 ng/µl), y 16.5 µl de agua desionizada en un volumen total de 25 µl.

Las condiciones RCP fueron 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos. 35 Ciclos cada a 98°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2.5 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.

La muestra fue luego mantenida a 12°C hasta retirarla de la máquina PCR.

[0316] Los productos reactivos fueron aislados por electroforesis 1.0% en gel de agarosa utilizando base 40 mM Tris, 20 mM acetato sódico, 1 mM tampón de EDTA (TAE) disodio donde una banda de producto de 1513 par de bases fue extirpada del gel y purificada utilizando un ilustra GFX® PCR DNA y un Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Brondby, Dinamarca) según las instrucciones del fabricante.

El fragmento fue luego clonado en *Bam* HI y *Xho* I digerido pDau109 utilizando un equipo de clonación de IN-FUSION™ dando como resultado el plásmido pP24F61.

La clonación del gen P24F61 en *Bam* HI-*Xho* I digerido pDau109 resultó en la transcripción del gen de *Talaromyces leycettanus* P24F61 bajo el control de un promotor doble NA2-tpi.

NA2-tpi es un promotor modificado del gen que codifica la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0317] El protocolo de clonación fue realizado según las instrucciones de equipo de clonación de IN-FUSION™ que generan una construcción GH10 P24F61.

El plásmido e inserto tratados fueron transformados en células de *E. coli* químicamente competentes Shot® TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante y colocados sobre placas LB suplementadas con 0.1 mg de ampicilina por ml.

Después de la incubación a 37°C durante toda la noche, se vio que las colonias crecían bajo selección en las placas de ampicilina LB.

Cuatro colonias transformadas con la construcción GH10 P24F61 fueron cultivadas en medio LB suplementado con 0.1 mg de ampicilina por ml y el plásmido fue aisladas con un equipo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante.

[0318] Los plásmidos aislados fueron ordenados con cebadores de vector y cebadores específicos de gen P24F61 para determinar un clon de expresión de plásmido representativo que estuviera libre de errores de PCR.

Ejemplo 9: Caracterización de la secuencia genómica de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 que codifica un polipéptido GH10 P24F61 con actividad de xilanasas

[0319] Secuenciación del ADN del clon genómico P24F61 GH10 de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 fue realizada con un secuenciador Applied Biosystems Model 3700 Automated DNA Sequencer que usa química de terminador de BIG-DYE™ de versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE.UU.) y estrategia de paseo con cebador.

Los datos de secuencia de nucleótidos fueron escrutinados respecto a la calidad y todas secuencias fueron comparadas unas a la otras con asistencia de software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).

La secuencia obtenida fue idéntica a la secuencia del JGI.

[0320] La secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen P24F61 *Talaromyces leycettanus* se muestra en SEC ID n.º: 3 y SEC ID n.º: 4, respectivamente.

La secuencia codificante es 1708 par de bases incluyendo el codón de terminación y se interrumpe por ocho intrones.

5 La proteína predicha codificada es 389 aminoácidos.

Usando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10 10: 1-6), un péptido señal de 16 residuos fue predicho.

La proteína madura predicha contiene 373 aminoácidos con una masa molecular predicha de 39.6 kDa y un pH isoelectrónico de 5.2.

10 [0321] Un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos fue determinado utilizando el algoritmo Needleman and Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) con penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5, y el matriz EBLOSUM62.

15 La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen *Talaromyces leycettanus* que codifica el polipéptido P24F61GH10 con actividad de xilanas comparte el 76.0% de identidad (espacios excluidos) a la secuencia de aminoácidos deducida de una proteína de familia GH10 predicha de *Talaromyces stipitatus* (número de registro SWISSPROT:B8M9H8) con actividad de xilanas putativa.

20 Ejemplo 10: Expresión de la xilanas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F61

[0322] El plásmido de expresión pP24F61 fue transformado en *Aspergillus oryzae* MT3568.

Aspergillus oryzae MT3568 es un derivado interrumpido de AMDS (acetamidasa) de JaL355 (WO 02/40694) donde auxotrofia *pyrG* fue restaurada en el proceso de eliminar el gen acetamidasa de *A. oryzae* (AMDS).

Protoplastos MT3568 se preparan según el método de patente europea n° 0238023, páginas 14-15.

25 [0323] Los transformantes fueron purificados en placas de selección de sacarosa de COVE a través de conidias únicas antes de esporularlos en placas PDA.

Producción del polipéptido GH10 de *Talaromyces leycettanus* por los transformantes fue analizada de sobrenadantes de cultivo de 1 ml en 96 pocillos de cultivos fijos profundos a 30°C en medio de glucosa YP+2%.

30 La expresión fue verificada en un gel de pocillo E-Page 8% SDS-PAGE 48 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) por coloración de Coomassie.

Un transformante fue seleccionado para trabajar más y asignado *Aspergillus oryzae* 40.2.3.

35 [0324] Para la producción a mayor escala, esporas de *Aspergillus oryzae* 40.2.3 fueron extendidas sobre una placa PDA e incubadas durante cinco días a 37°C.

La placa de espora confluente se lavó dos veces con 5 ml de 0.01% TWEEN® 20 para maximizar el número de esporas recogidas.

La suspensión de esporas fue luego usada para inocular veinticinco matraces de 500 ml con 100 ml de medio Dap-4C.

40 El cultivo fue incubado a 30°C con agitación constante a 100 r.p.m.

Al cuarto día después de la inoculación, el caldo de cultivo fue recogido por filtración a través de un filtro de tapón de botellas MF75 Supor MachV 0.2 µm PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).

El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda de proteína GH10 de aproximadamente 40 kDa.

45 La identidad de esta banda como el polipéptido GH10 de *Talaromyces leycettanus* fue verificada por secuenciación de péptido.

Ejemplo 11: Método alternativo para la producción de la xilanas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F61

50 [0325] Basado en la secuencia de nucleótidos identificada como SEC ID n.º: 3, un gen sintético puede ser obtenido de un número de vendedores tales como Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Alemania) o DNA 2.0 (DNA2.0, 1430 O'Brien Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, USA).

El gen sintético se puede diseñar para incorporar secuencias de ADN adicionales tales como sitios de restricción o regiones de recombinación homólogas para facilitar la clonación en un vector de expresión.

55 [0326] Usando los dos cebadores oligonucleótidos sintéticos F-P24F61 y F-P24F61 anteriormente descritos, una reacción por PCR simple puede utilizarse para amplificar el marco de lectura abierto en toda su longitud del gen sintético de SEC ID n.º: 3.

El gen puede después ser clonado en un vector de expresión por ejemplo como se ha descrito anteriormente y expresado en una célula huésped, por ejemplo en *Aspergillus oryzae* como se ha descrito anteriormente.

60 Ejemplo 12: Purificación de la xilanas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F61

[0327] 1000 ml de caldo de la cepa de expresión de *Aspergillus oryzae* 40.2.3 fue ajustado a pH 7.0 y filtrado en un filtro 0.22 µm PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).

65 Después, al filtrado se le añadió 1.4 M de sulfato de amonio.

El filtrado fue cargado sobre una columna Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (high sub) (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, USA) (con un volumen de columna de 60 mL) equilibrada con 1.4 M de sulfato de amonio pH 7.0, 25 mM HEPES pH 7.0.

Después de la aplicación, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado seguida de 7 volúmenes de columna de 0.8 M sulfato de amonio (la proteína siguió uniéndose a la columna) y la proteína fue eluida después con 5 volúmenes de columna de 25 mM HEPES 7.0 pH a una velocidad de flujo de 15 ml/min.

Las fracciones de 10 mL fueron recogidas y analizadas por SDS-page.

Las fracciones fueron agrupadas y aplicadas a una columna equilibrada Sephadex™ G-25 (medio) (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, EE.UU.) en 25 mM HEPES 7.0 pH.

Las fracciones fueron aplicadas a una columna equilibrada SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, EE.UU.) en 25 mM HEPES pH 7.0 (volúmenes de columna 60 mL).

Después de la aplicación, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y las proteínas ligadas fueron eluidas un gradiente lineal sobre 20 volúmenes de columna de 0-1000 mM de cloruro sódico.

Las fracciones de 10 ml fueron recogidas y analizadas por SDS-page.

La enzima estuvo en el ensayo y en las primeros fracciones y fue agrupada a consecuencia.

Con dos picos diferentes en el cromatograma se hicieron dos depósitos.

La enzima fue concentrada utilizando una membrana de polietersulfona de concentrador por centrifugación Vivaspín®20 de MWCO 10,000 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 37070 Goettingen, Alemania).

La concentración de proteína fue determinada por absorbancia A280/A260.

La identidad de proteína fue verificada por MS/MS en la muestra digerida en gel.

Ejemplo 13: Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene secuencia genómica de cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 que codifica un polipéptido de la familia GH10 con actividad de xilanasas

[0328] Los dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados debajo fueron diseñados para amplificar PCR el gen de la cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 P24F62 (SEC ID n.º: 5) del ADN genómico preparado en el ejemplo 2.

Un equipo de clonación de IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU.) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pDau109 (WO 2005/042735).

F-P24F62

5'- ACACAACTGGGGATCCACCATGCGTTTCTCCTTGCCACTG -3' (SEC ID n.º: 11)

R-P24F62

5'- CCCTCTAGATCTCGAGCTAGCAGACGCTGCAGGCCT -3' (SEC ID n.º: 12)

[0329] Las letras en negrita representan la secuencia de genes. La secuencia subrayada es homóloga a los sitios de inserción de pDau109.

[0330] Un motor MJ Research PTC-200 DNA fue usado para realizar la reacción por PCR.

Un Phusion® High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) fue usado para la amplificación de PCR.

La reacción por PCR fue compuesta por 5 µl de tampón 5X HF (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de Polimerasa de DNA de phusion® (0.2 unidades/µl) (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 1 µl de cebador F-P24F62 (5 µM), 1 µl de cebador R-P24F62 (5 µM), 0.5 µl de ADN genómico de *Talaromyces leycettanus* (100 ng/µl), y 16.5 µl de agua desionizada en un volumen total de 25 µl.

Las condiciones RCP fueron 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos. 35 ciclos cada a 98°C durante 10 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2.5 minutos; y 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.

La muestra fue luego mantenida a 12°C hasta retirarla de la máquina PCR.

[0331] Los productos reactivos fueron aislados por electroforesis 1.0% en gel de agarosa utilizando base 40 mM Tris, 20 mM acetato sódico, 1 mM tampón de EDTA (TAE) disodio donde una banda de producto de 1513 par de bases fue extirpada del gel y purificada utilizando un ilustra GFX® PCR DNA y Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Brøndby, Dinamarca) según las instrucciones del fabricante.

El fragmento fue luego clonado en *Bam* HI y *Xho* I digerido pDau109 utilizando un equipo de clonación de IN-FUSION™ dando como resultado plásmido pP24F62.

La clonación del gen P24F62 en *Bam* HI-*Xho* I digerido pDau109 resultó en la transcripción del gen *Talaromyces leycettanus* P24F62 bajo el control de un promotor doble NA2-tpi.

NA2-tpi es un promotor modificado del gen que codifica la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0332] El protocolo de clonación fue realizado según las instrucciones de equipo de clonación de IN-FUSION™ que generan una construcción P24F62 GH10.

El plásmido y el inserto tratados fueron transformados en células de *E. coli* químicamente competente Shot® TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante y colocados sobre placas LB suplementadas con 0.1 mg de ampicilina por ml.

Después de la incubación a 37°C durante toda la noche, se vio que las colonias crecían bajo selección en las placas de ampicilina LB.

Cuatro colonias transformadas con la construcción GH10 P24F62 fueron cultivadas en un medio LB suplementado con 0.1 mg de ampicilina por ml y el plásmido fue aislado con un QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante.

[0333] Los plásmidos aislados fueron secuenciados con cebadores de vector y cebadores específicos de gen P24F62 para determinar un clon de expresión de plásmido representativo que estuviera libre de errores de PCR.

Ejemplo 14: Caracterización de la secuencia genómica de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 que codifica un polipéptido GH10 P24F62 con actividad de xilanasas

[0334] La secuenciación del ADN del clon genómico GH1 de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68 P24F620 fue realizada con un Applied Biosystems Model 3700 Automated DNA Sequencer que usa química de terminador de BIG-DYE™ versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE.UU.) y estrategia de paseo con cebador.

Los datos de secuencia de nucleótidos fueron escrutinados en relación a la calidad y todas las secuencias fueron comparadas unas a las otras con asistencia de software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).

La secuencia obtenida fue idéntica a la secuencia del JGI.

[0335] La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Talaromyces leycettanus* P24F62 se muestran en SEC ID n.º: 5 y SEC ID n.º: 6, respectivamente.

La secuencia codificante es 1520 par de bases incluyendo el codón de terminación y se interrumpe por cuatro intrones.

La proteína predicha codificada es 405 aminoácidos.

Usando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 20 residuos fue predicho.

La proteína madura predicha contiene 385 aminoácidos con una masa molecular predicha de 41.6 kDa y un pH isoelectrónico de 4.7.

[0336] Un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos fue determinado utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) con penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5, y el matriz EBLOSUM62.

La alineación mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen que codifica el polipéptido P24F62 GH10 de *Talaromyces leycettanus* con actividad de xilanasas comparte un 83.0% en identidad (espacios excluidos) a la secuencia de aminoácidos deducida de una proteína de familia GH10 predicha de *Penicillium* sp. (número de registro GENESEQP:AYL61291) con actividad de xilanasas.

Ejemplo 15: Expresión de la xilanasas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F62

[0337] El plásmido de expresión pP24F62 fue transformado en *Aspergillus oryzae* MT3568.

Aspergillus oryzae MT3568 es un derivado interrumpido de AMDS (acetamidasa) de JaL355 (WO 02/40694) donde auxotrofia *pyrG* fue restaurada en el proceso de retirar el gen de acetamidasa de *A. oryzae* (AMDS).

Los protoplastos MT3568 se preparan según el método de la patente europea n° 0238023, páginas 14-15.

[0338] Los transformantes fueron purificados en placas de selección de sacarosa de COVE a través de conidias únicas antes de esporularlos en placas PDA.

La producción del polipéptido GH10 de *Talaromyces leycettanus* por los transformantes fue analizada de sobrenadantes de cultivo de 1 ml cultivos fijos de 96 pocillos profundos a 30°C en medio de glucosa YP+2%.

La expresión fue verificada en un gel de pocillo E-Page 8% SDS-PAGE 48 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) por coloración de Coomassie.

Un transformante fue seleccionado para seguir trabajando y designado *Aspergillus oryzae* 39.3.1.

[0339] Para producción a gran escala, las esporas de *Aspergillus oryzae* 39.3.1 fueron extendidas sobre una placa PDA e incubadas durante cinco días a 37°C.

La placa de espasa confluente se lavó dos veces con 5 ml de 0.01% TWEEN® 20 para maximizar el número de esporas recogidas.

La suspensión de esporas fue luego usada para inocular veinticinco matraces de 500 ml con 100 ml de medio Dap-4C.

El cultivo fue incubado a 30°C con agitación constante a 100 r.p.m.

Al cuarto día después de la inoculación, el caldo de cultivo fue recogido por filtración a través de un filtro de tapa de botellas MF75 Supor MachV 0.2 µm PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).

El caldo de cultivo fresco de este transformante produjo una banda de proteína GH10 de aproximadamente 50 kDa.

La identidad de esta banda como el polipéptido GH10 de *Talaromyces leycettanus* fue verificada por secuenciación de péptido.

Ejemplo 16: Método alternativo para la producción de la xilanasas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F62

5 [0340] Basado en la secuencia de nucleótidos identificada como SEC ID n.º: 5, un gen sintético puede ser obtenido de un número de vendedores tales como Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11, 93053, Regensburg, Alemania) o DNA 2.0 (DNA2.0, 1430 O'Brien Drive, Suite E, Menlo Park, CA 94025, USA). El gen sintético se puede diseñar para incorporar secuencias de ADN adicionales tales como sitios de restricción o regiones de recombinación homólogas para facilitar la clonación en un vector de expresión.

10 [0341] Utilizando los dos cebadores oligonucleótidos sintéticos F-P24F62 y R-P24F62 anteriormente descritos, una reacción por PCR simple puede utilizarse para amplificar el marco de lectura abierto en toda su longitud del gen sintético de SEC ID n.º: 5. El gen puede después ser clonado en un vector de expresión por ejemplo como se ha descrito anteriormente y expresado en una célula huésped, por ejemplo en *Aspergillus oryzae* como se ha descrito anteriormente.

15 Ejemplo 17: Purificación de la xilanasas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F62

[0342] 1000 ml de caldo de la cepa de expresión de *Aspergillus oryzae* 39.3.1 fue ajustado a pH 7.0 y filtrado en 0.22 µm de filtro PES (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca).

20 Después, al filtrado se le añadió 1.4 M de sulfato de amonio. El filtrado fue cargado sobre una columna Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (alto sen sustituto) (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, USA) (con un volumen de columna de 60 mL) equilibrada con 1.4 M de sulfato de amonio pH 7.0, 25 mM HEPES pH 7.0.

25 Después de la aplicación, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado seguido de 7 volúmenes de columna de 0.8 M sulfato de amonio (la proteína mantuvo el enlace a la columna) y la proteína fue eluida después con 5 volúmenes de columna de 25 mM HEPES pH 7.0 a una velocidad de flujo de 15 ml/min.

Las fracciones de 10 mL fueron recogidas y analizadas por SDS-page. Las fracciones fueron agrupadas y aplicadas a una columna equilibrada Sephadex™ G-25 (medio) (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, EE.UU.) en 25 mM HEPES pH 7.0.

30 Las fracciones fueron aplicadas a una columna equilibrada SOURCE™ 15Q (GE Healthcare, PISCATAWAY, NJ, EE.UU.) en 25 mM HEPES pH 7.0 (volúmenes de columna 60 mL).

Después de la aplicación de la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado de volúmenes de columna y las proteínas ligadas fueron eluidas con un gradiente lineal sobre 20 volúmenes de columna de 0-1000 mM de cloruro sódico.

35 Las fracciones de 10 ml fueron recogidas y analizadas por SDS-page. La enzima estuvo en el ensayo y en las primeras fracciones y fue agrupada a consecuencia. Con dos picos diferentes en el cromatograma se hicieron dos depósitos. La enzima fue concentrada utilizando una membrana de polietersulfona concentradora por centrifugación Vivaspin®20 de MWCO 10,000 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, 37070 Goettingen, Alemania).

40 La concentración de proteína fue determinada por absorbancia A280/A260. La identidad de proteína fue verificada por MS/MS en la muestra digerida en gel.

Ejemplo 18: Determinación de actividad de xilanasas de las xilanasas según la invención

45 Actividad enzimática de la xilanasas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F5Z

[0343] Grupo A y grupo B de la xilanasas purificada fueron diluidos en agua destilada con 0.01% Tritón X-100 (100 ppm) en base a una curva de dosis-respuesta para estar en el rango lineal.

50 El sustrato fue AZCL-arabinosilano (Wicklow Megazyme, Irlanda) en 0.2 % (p/v) en el pH 6.0 en (50 mM ácido fosfórico, 50 mM ácido acético, 50 mM ácido bórico), 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.01% Tritón X-100; pH ajustado con NaOH.

El sustrato fue equilibrado a 37°C. 1000 µl 0.2 % (p/v) AZCL-arabinosilano fue mezclado con 20 µl de enzima diluida. El tubo fue incubado a 37°C durante 15 minutos en un termomezclador Eppendorf Comfort (AG de Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 1.400 r.p.m.

55 La reacción fue detenida por la colocación del tubo en hielo durante 5 minutos. El tubo Eppendorf fue centrifugado 5 minutos con 10,000 r.p.m. a 4°C. 200 Microlitros de sobrenadante fueron transferidos a una placa de fondo plano MicroWell (NUNC, Roskilde, Dinamarca) y la absorbancia se leyó a 595nm en un espectrofotómetro.

60 Con respecto a Shearzyme (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), la actividad específica en el AZCL-arabinosilano resultó ser 2 % para el grupo A y 4 % para el grupo B.

Actividad enzimática de la xilanasas GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F61

65 [0344] La xilanasas purificada fue diluida en el agua destilada con 0.01% Tritón X-100 (100 ppm) en base a una curva de dosis-respuesta para estar en el rango lineal.

El sustrato fue AZCL-arabinosilano (Wicklow Megazyme, Irlanda) en 0.2 % (p/v) en el pH 6.0 en (50 mM ácido fosfórico, 50 mM ácido acético, 50 mM ácido bórico), 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.01% Tritón X-100; pH ajustado con NaOH.

El sustrato fue equilibrado a 37°C. 1000 µl AZCL-arabinosilano 0.2 % (p/v) fueron mezclados con 20 µl de enzima diluida.

El tubo fue incubado a 37°C durante 15 minutos en un termomezclador de Eppendorf Comfort (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 1.400 r.p.m.

La reacción fue detenida por la colocación del tubo en el hielo durante 5 minutos.

El tubo de Eppendorf fue centrifugado 5 minutos con 10,000 r.p.m. a 4°C. 200 microlitros de sobrenadante se transfirieron a una placa de fondo plano MicroWell (NUNC, Roskilde, Dinamarca) y la absorbancia fue leída a 595nm en un espectrofotómetro.

Con respecto a Shearzyme (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), la actividad específica en el AZCL-arabinosilano resultó ser de 830 % para la xilanasa purificada.

15 Actividad enzimática de la xilanasa GH10 de *Talaromyces leycettanus* P24F62

[0345] La xilanasa purificada fue diluida en el agua destilada con 0.01% de Tritón X-100 (100 ppm) en base a una curva de dosis-respuesta para estar en el rango lineal.

El sustrato fue AZCL-arabinosilano (Wicklow Megazyme, Irlanda) en 0.2 % (p/v) en el pH 6.0 en (50 mM ácido fosfórico, 50 mM ácido acético, 50 mM ácido bórico), 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.01% Tritón X-100; pH ajustado con NaOH.

El sustrato fue equilibrado a 37°C. 1000 µl de AZCL-arabinosilano 0.2 % (p/v) fueron mezclados con 20 µl enzima diluida.

El tubo fue incubado a 37°C durante 15 minutos en un termomezclador de Eppendorf Comfort(Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 1.400 r.p.m.

La reacción fue detenida por la colocación del tubo en hielo durante 5 minutos.

El tubo de Eppendorf fue centrifugado 5 minutos con 10,000 r.p.m. a 4°C. 200 Microlitros sobrenadante fueron transferidos a una placa de fondo plano MicroWell (NUNC, Roskilde, Dinamarca) y la absorbancia fue leída a 595nm en un espectrofotómetro.

Con respecto a Shearzyme (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), la actividad específica en el AZCL-arabinosilano resultó ser 950 % para la xilanasa purificada.

[0346] La invención descrita y reivindicada en el presente documento no ha de limitarse en su alcance por los aspectos específicos descritos en este documento, ya que estos aspectos se idean como ilustraciones de varios aspectos de la invención.

Se pretende que todos los aspectos equivalentes estén dentro del alcance de esta invención.

De hecho, varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior.

Tales modificaciones también están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

En caso de conflicto, la presente descripción, incluyendo las definiciones, tendrá el control.

[0347] La presente divulgación además incluye el objeto descrito por los siguientes párrafos numerados:

[1] Un polipéptido aislado con actividad de xilanasa, seleccionado del grupo consistente en:

(a) un polipéptido con al menos 77%, por ejemplo, al menos 78%, al menos 79%, 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% identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, o un polipéptido con al menos 77%, por ejemplo, al menos 78%, al menos 79%, 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% identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 4, o un polipéptido con al menos 85%, por ejemplo, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, 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% en identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 6;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibridiza en condiciones de astringencia bajas, o condiciones de astringencia media, o condiciones de astringencia medio altas, o condiciones de astringencia altas, o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 3, o SEC ID n.º: 5, (ii) la secuencia de ADNc de la misma, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii);

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 60%, por ejemplo, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, 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% en identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 3, o SEC ID n.º: 5; o la secuencia de ADNc de la misma;

(d) una variante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 4, o SEC ID n.º: 6 que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o varias posiciones; y

(e) un fragmento del polipéptido de (a); (b), (c), o (d) que tiene actividad de xilanasas.

[2] El polipéptido del párrafo 1, con al menos 77%, al menos 78%, al menos 79%, 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% identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; teniendo al menos 77%, al menos 78%, al menos 79%, 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% en identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 4; o con al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, 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% en identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 6.

[3] El polipéptido de párrafo 1 o 2, que se codifica por un polinucleótido que hibridiza en condiciones de astringencia bajas, o condiciones de astringencia medio-bajas, o condiciones de astringencia medias, o condiciones de astringencia medio altas, o condiciones de astringencia altas, o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 3, o SEC ID n.º: 5, (ii) la secuencia de ADNc de la misma, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii).

[4] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-3, que se codifica por un polinucleótido con al menos 60%, al menos 65%, 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% en identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 3, o SEC ID n.º: 5 o la secuencia de ADNc de la misma.

[5] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-4, que comprende o consistente en SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 4, o SEC ID n.º: 6 o el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 4, o SEC ID n.º: 6.

[6] El polipéptido de párrafo 5, donde el polipéptido maduro es aminoácidos 18 a 364 de SEC ID n.º: 2, aminoácidos 17 a 389 de SEC ID n.º: 4, o aminoácidos 21 a 405 de SEC ID n.º: 6.

[7] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-4, que es una variante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 4, o SEC ID n.º: 6 que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o varias posiciones.

[8] El polipéptido de párrafo 1, que es un fragmento de SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 4, o SEC ID n.º: 6, donde el fragmento tiene actividad de xilanasas.

[9] Un polipéptido aislado que comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo consistente en:

(a) un dominio catalítico con al menos 77% en identidad de secuencia al dominio catalítico de SEC ID n.º: 2 o SEC ID n.º: 4, o un dominio catalítico con al menos 85% en identidad de secuencia al dominio catalítico de SEC ID n.º: 6;

(b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido con al menos 60% en identidad de secuencia a la secuencia codificante de dominio catalítico de SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 3, o SEC ID n.º: 5;

(c) una variante de un dominio catalítico que comprende una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del dominio catalítico de SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 4, o SEC ID n.º: 6; y

(d) un fragmento de un dominio catalítico de (a); (b), o (c), que tiene actividad de xilanasas.

[10] El polipéptido de párrafo 9, que comprende o consistente en el dominio catalítico de SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 4, o SEC ID n.º: 6.

[11] El polipéptido de párrafo 10, donde el dominio catalítico es aminoácidos 18 a 364 de SEC ID n.º: 2, aminoácidos 17 a 326 de SEC ID n.º: 4, o aminoácidos 21 a 337 de SEC ID n.º: 6.

[12] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 9-11, que comprende además un dominio de enlace a la celulosa.

[13] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-12, que se codifica por el polinucleótido contenido en la cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68.

[14] Una composición que comprende el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-13.

[15] Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-13.

[16] Un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido de párrafo 15 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

[17] Una célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido de párrafo 15 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

[18] Un método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-13, que comprende:

(a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y

(b) recuperación del polipéptido.

[19] Un método para producir un polipéptido con actividad de xilanasas, que comprende:

(a) cultivo de la célula huésped de párrafo 17 en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y

(b) recuperación del polipéptido.

[20] Una planta, parte de planta o célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-13.

[21] Un método para producir un polipéptido con actividad de xilanasas, que comprende:

- (a) cultivo de la planta transgénica o célula vegetal de párrafo 20 en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- (b) recuperación del polipéptido.

[22] Un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal que comprende o consiste en aminoácidos 1 a 17 de SEC ID n.º: 2, aminoácidos 1 a 16 de SEC ID n.º: 4, o aminoácidos 1 a 20 de SEC ID n.º: 6.

[23] Un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido de párrafo 22, donde el gen es extranjero para el polinucleótido que codifica el péptido señal.

[24] Una célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido de párrafo 22, donde el gen es extranjero para el polinucleótido que codifica el péptido señal.

[25] Un 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 de párrafo 22, donde el gen es extranjero para el polinucleótido que codifica el péptido señal, en condiciones propicias para la producción de la proteína; y
- (b) recuperación de la proteína.

[26] Un proceso para la degradación 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 con actividad de xilanasas de cualquiera de los párrafos 1-13.

[27] El proceso de párrafo 26, donde el material celulósico o material que contiene xilano es pretratado.

[28] El proceso de párrafo 26 o 27, donde la composición enzimática comprende una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, un polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasa, una esterasa, una expansina, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

[29] El proceso de párrafo 28, donde la hemicelulasa es una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una xilanasas, una acetilxilano esterasa, una feruloil esterasa, una arabinofuranosidasa, una xilosidasa, y una glucuronidasa.

[30] El proceso de párrafo 28, donde la celulasa es una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

[31] El proceso de cualquiera de párrafos 26-30, que comprende además la recuperación del material celulósico o material que contiene xilano degradado.

[32] El proceso de párrafo 31, donde el material celulósico o material que contiene xilano es un azúcar degradado.

[33] El proceso de párrafo 32, donde el azúcar es seleccionado del grupo consistente en glucosa, xilosa, manosa, galactosa, y arabinosa.

[34] Un proceso para producir un producto de fermentación, que comprende:

- (a) sacarificación de un material celulósico o material que contiene xilano con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad de xilanasas de cualquiera de los párrafos 1-13;
- (b) fermentación del material celulósico sacarificado o material que contiene xilano con uno o varios microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y
- (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

[35] El proceso de párrafo 34, donde el material celulósico o material que contiene xilano es pretratado.

[36] El proceso de párrafo 34 o 35, donde la composición enzimática comprende una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, un polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasa, una esterasa, una expansina, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

[37] El proceso de párrafo 36, donde la hemicelulasa es una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una xilanasas, una acetilxilano esterasa, una feruloil esterasa, una arabinofuranosidasa, una xilosidasa, y una glucuronidasa.

[38] El proceso de párrafo 36, donde la celulasa es una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

[39] El proceso de cualquiera de los párrafos 34-38, donde los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente en una sacarificación y fermentación simultáneas.

[40] El proceso de cualquiera de los párrafos 34-39, donde el producto de fermentación es un alcohol, un alcano, un cicloalcano, un alqueno, un aminoácido, un gas, un isopreno, una cetona, un ácido orgánico, o policétido.

[41] Un proceso de la fermentación de un material celulósico o material que contiene xilano, que comprende: fermentar el material celulósico o material que contiene xilano con uno o varios microorganismos fermentadores, donde el material celulósico o material que contiene xilano se sacarifica con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad de xilanasas de cualquiera de los párrafos 1-13.

[42] El proceso de párrafo 41, donde la fermentación del material celulósico o material que contiene xilano produce un producto de fermentación.

[43] El proceso de párrafo 42, que comprende además la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

5 [44] El proceso de cualquiera de los párrafos 41-43, donde el material celulósico o material que contiene xilano es pretratado antes de la sacarificación.

[45] El proceso de cualquiera de los párrafos 41-44, donde la composición enzimática comprende una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, un polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celololítica, una hemicelulasa, una esterasa, una expansina, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

10 [46] El proceso de párrafo 45, donde la hemicelulasa es una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una xilanasas, una acetilxilano esterasa, una feruloil esterasa, una arabinofuranosidasa, una xilosidasa, y una glucuronidasa.

15 [47] El proceso de párrafo 45, donde la celulasa es una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

[48] El proceso de cualquiera de los párrafos 41-47, donde el producto de fermentación es un alcohol, un alcano, un cicloalcano, un alqueno, un aminoácido, un gas, isopreno, una cetona, un ácido orgánico, o policétido.

20 Listado de secuencias

[0348]

25 <110> Novozymes A/S
Spodsberg, Nikolaj

<120> Polipéptidos con actividad de xilanasas y polinucleótidos que codifican los mismos

30 <130> 12262-WO-PCT

<160> 12

35 <170> PatentIn 3 versión.5

<210> 1

<211> 1168

<212> ADN

40 <213> Talaromyces leycettanus

<400> 1

ES 2 586 307 T3

| | |
|---|------|
| atgcgtttct ccttggccac tgcagctctt ctcgctggcc ctgccctggc agcgccacca | 60 |
| gctcctcgtc acgatgacaa ggatggtggg ctcaacgccc tggcccagag agcaggcaag | 120 |
| ctctggttcg gcaactgctg tgatatcccc ggcaccgacg agacgaccga tgctgcttac | 180 |
| ctaaaaatct tggaaaatcc cgccaacttc ggcgagatca cccctgccaa cgccatgaag | 240 |
| gtacggagct gcttgacaag tcggaggatc atgcctacga gcgaacaaac ttccgatgct | 300 |
| gacgcattga cagttcatgt acaccgagcc agagcagaac gtgttcaact acaccggcgg | 360 |
| tgactacgtc ctgaacctcg ccgagcgcca cggccagcgt gtccgctgcc acaacctcgt | 420 |
| ctgggccagc cagctgtccg acttcgtcaa caacggcaac tggaccaagg agtccctcac | 480 |
| ggcctgatg cggaaccaca tcttccacgt cgtccagcac ttcggccggc gctgctactc | 540 |
| gtgggatgtc gtcaacgagg ccctcaacgg cgacggcacc ttctcctcca gcatctggtg | 600 |
| cgacaccatc ggcgaggact acttctacct cgccttccag tacgcccagg aggccctcgc | 660 |
| ggagatccac gccaacgacg tcaagctcta ctacaacgac tacggcatcg agaaccccgg | 720 |
| caccaaggcc gatgccgtgc acaacctcgt caaggagctg cgcaagcgcg acatccgat | 780 |
| cgacggcatc ggtctcgagt cccacttcga ggtcggtttc accccctccc tacaggacca | 840 |
| gctcagcacc aagcagggt acatcgcgct cggctctgac gtcgccatca ccgagctgga | 900 |
| cgtgcgcttc acccaggccc ctactacga tgccgcgggc gagaagcagc aggccagga | 960 |
| ctactatacc agcgtttcta gctgcatcga ggccggcccc aagtgcatcg gtatcacctg | 1020 |
| ctgggacttc gatgacaagt actcgtgggt tccttacctc ttcgccggcc aggggtggtg | 1080 |
| agatatctac aatgctacct tgcaggccaa gcctgcctac tatgccattg ccgatgctct | 1140 |
| tcagggcaag gcctgcagcg tctgctag | 1168 |
| <210> 2 | |
| <211> 364 | |
| <212> PRT | |
| <213> Talaromyces leycettanus | |
| <400> 2 | |

5

ES 2 586 307 T3

Met Arg Phe Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Ala Gly Pro Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Pro Pro Ala Pro Arg His Asp Asp Lys Asp Val Gly Leu Asn
20 25 30

Ala Leu Ala Gln Arg Ala Gly Lys Leu Trp Phe Gly Thr Ala Ala Asp
35 40 45

Ile Pro Gly Thr Asp Glu Thr Thr Asp Ala Ala Tyr Leu Lys Ile Leu
50 55 60

Glu Asn Pro Ala Asn Phe Gly Glu Ile Thr Pro Ala Asn Ala Met Lys
65 70 75 80

Phe Met Tyr Thr Glu Pro Glu Gln Asn Val Phe Asn Tyr Thr Gly Gly
85 90 95

Asp Tyr Val Leu Asn Leu Ala Glu Arg His Gly Gln Arg Val Arg Cys
100 105 110

His Asn Leu Val Trp Ala Ser Gln Leu Ser Asp Phe Val Asn Asn Gly
115 120 125

Asn Trp Thr Lys Glu Ser Leu Thr Ala Val Met Arg Asn His Ile Phe
130 135 140

His Val Val Gln His Phe Gly Arg Arg Cys Tyr Ser Trp Asp Val Val
145 150 155 160

Asn Glu Ala Leu Asn Gly Asp Gly Thr Phe Ser Ser Ser Ile Trp Tyr
165 170 175

Asp Thr Ile Gly Glu Asp Tyr Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Tyr Ala Gln
180 185 190

Glu Ala Leu Ala Glu Ile His Ala Asn Asp Val Lys Leu Tyr Tyr Asn
195 200 205

Asp Tyr Gly Ile Glu Asn Pro Gly Thr Lys Ala Asp Ala Val His Asn
210 215 220

Leu Val Lys Glu Leu Arg Lys Arg Asp Ile Arg Ile Asp Gly Ile Gly
225 230 235 240

ES 2 586 307 T3

Leu Glu Ser His Phe Glu Val Gly Phe Thr Pro Ser Leu Gln Asp Gln
 245 250 255

Leu Ser Thr Lys Gln Gly Tyr Ile Ala Leu Gly Leu Asp Val Ala Ile
 260 265 270

Thr Glu Leu Asp Val Arg Phe Thr Gln Ala Pro Tyr Tyr Asp Ala Ala
 275 280 285

Gly Glu Lys Gln Gln Ala Gln Asp Tyr Tyr Thr Ser Val Ser Ser Cys
 290 295 300

Ile Glu Ala Gly Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Asp Phe Asp
 305 310 315 320

Asp Lys Tyr Ser Trp Val Pro Tyr Thr Phe Ala Gly Gln Gly Gly Ala
 325 330 335

Asp Ile Tyr Asn Ala Thr Leu Gln Ala Lys Pro Ala Tyr Tyr Ala Ile
 340 345 350

Ala Asp Ala Leu Gln Gly Lys Ala Cys Ser Val Cys
 355 360

<210> 3
 <211> 1708
 <212> ADN
 <213> Talaromyces leycettanus

5

<400> 3
 atgggtccgctc tttccgctgg acttatcgctc ctccccctcg tgtccgcccgc ggccgctogat 60
 ctccagagacc gccaggcggc acagagcatc aacaccctca tccaggccaa gggcaagaag 120
 tactggggca cttgcgccga tgagggccga ttgaccgaga actcgcaaaa cccggccatc 180
 gccaaggcgg actttggcca ggtgacgcca gagaacagca tgaagtggga tgctactgag 240
 cgttagtcag gatgtccatg tgcaatatat agatggatgg ctaactgctg ttgatgtgta 300
 gcaagccagg gccagttcaa ctttgctcag gctgattggg ttgtaagtga agctggcatg 360
 ttgttcagat cctagactgt acggctggct gactgttctc aaggtcaact gggcgcagca 420
 aatggcaag ctgatccgag gccacaacct gggtgagtcc tgttcatcat cacaatcgctc 480
 atagtagcta cgaacacgct aacttatgtg tcaacagtgt ggcactccca gctcccatcc 540
 tgggtgtgcg gtatcaccga caagacggca ttgaccaatg ccatgaccaa ccacatcacc 600
 accctgggtga gccgctataa ggggaagatc tatgcctggg taagtgtttt tcttttctct 660
 actgatatca gttccagaga aacggaggcc actgacagtt gtacaggacg tcgtcaacga 720

ES 2 586 307 T3

acccttcaac gaagatggaa gtcttctgca gacctgcttc tacaacgtca tcggacctga 780
ctacatcaag attgccttcc aaacagctcg tgcggccgat ccgaacgcga agctctacgt 840
caatgattac aagtaagact gatcaagtcc cagccttagc tgcgttaatc cgctgacatt 900
cataacctca gccttgactc cgcttctac gccaaagacca ccggcgtggc gaaccaggtc 960
aagcagtgga ttgcacaggg tgtcccgatt gacggattg gttctgagtc tcaccttagg 1020
tatagctgac tcccatgtct caagtcaatg ctagttgtga acgtgtactt acgactttca 1080
aaaacagcgc cgggtgcagga gcgggtgtgc cagctgcctt gcaagtgtc gccaatccg 1140
gagtctccga ggctcgcgatc accgaactcg atatcgcca agcctcatcc actgactatg 1200
acaacgtaag aagaactctt ctgatatact ctttaaacca taaagtgtcg tgtgactaac 1260
actctttttt tttcaacata ggtcgcccaa gcctgcctga acgtcgcgaa gtgtgttggg 1320
atcacttctt ggggtatctc tgataaggtc cgtttcatgc ctgcatttcc ctccctgaa 1380
agacaagatg tgtctttcca ttgattgtg acgcctaaat caataacagg actcctggcg 1440
ctccagcgag aacctgatc tcttcgacag caactatcag cccaaggctg cctacaatgc 1500
tcttgtgacc ttgctcggg gaagctccgg ctccggctct ggctctggct ctggctctgg 1560
ctctggctca ggctcaggct caggctcagg ctccggccag gctcaacact ggggtcagtg 1620
tggtggcgaa ggctggaccg gaccaacgtc ctgtgtctct ccatacactt gccagtacca 1680
gaaccagtgg tactcccagt gcttgtaa 1708

<210> 4
<211> 389
<212> PRT
<213> Talaromyces leycettanus

<400> 4

Met Val Arg Leu Ser Ala Gly Leu Ile Val Leu Pro Leu Val Ser Ala
1 5 10 15
Ala Ala Val Asp Leu Gln Ser Arg Gln Ala Ala Gln Ser Ile Asn Thr
20 25 30
Leu Ile Gln Ala Lys Gly Lys Lys Tyr Trp Gly Thr Cys Ala Asp Glu
35 40 45
Gly Arg Leu Thr Glu Asn Ser Gln Asn Pro Ala Ile Ala Lys Ala Asp
50 55 60
Phe Gly Gln Val Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu
65 70 75 80

ES 2 586 307 T3

Pro Ser Gln Gly Gln Phe Asn Phe Ala Gln Ala Asp Trp Leu Val Asn
 85 90 95
 Trp Ala Gln Gln Asn Gly Lys Leu Ile Arg Gly His Asn Leu Val Trp
 100 105 110
 His Ser Gln Leu Pro Ser Trp Val Cys Gly Ile Thr Asp Lys Thr Ala
 115 120 125
 Leu Thr Asn Ala Met Thr Asn His Ile Thr Thr Leu Val Ser Arg Tyr
 130 135 140
 Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Pro Phe Asn Glu
 145 150 155 160
 Asp Gly Ser Leu Arg Gln Thr Cys Phe Tyr Asn Val Ile Gly Pro Asp
 165 170 175
 Tyr Ile Lys Ile Ala Phe Gln Thr Ala Arg Ala Ala Asp Pro Asn Ala
 180 185 190
 Lys Leu Tyr Val Asn Asp Tyr Asn Leu Asp Ser Ala Ser Tyr Ala Lys
 195 200 205
 Thr Thr Gly Val Ala Asn Gln Val Lys Gln Trp Ile Ala Gln Gly Val
 210 215 220
 Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Glu Ser His Leu Ser Ala Gly Ala Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Pro Ala Ala Leu Gln Val Leu Ala Asn Ser Gly Val Ser
 245 250 255
 Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Ala Gln Ala Ser Ser Thr Asp
 260 265 270
 Tyr Asp Asn Val Ala Gln Ala Cys Leu Asn Val Ala Lys Cys Val Gly
 275 280 285
 Ile Thr Ser Trp Gly Ile Ser Asp Lys Asp Ser Trp Arg Ser Ser Glu
 290 295 300
 Asn Pro Asp Leu Phe Asp Ser Asn Tyr Gln Pro Lys Ala Ala Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ala Leu Val Thr Leu Leu Gly Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 325 330 335

ES 2 586 307 T3

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 340 345 350

Gly Gln Ala Gln His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Glu Gly Trp Thr Gly
 355 360 365

Pro Thr Ser Cys Val Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Tyr Gln Asn Gln Trp
 370 375 380

Tyr Ser Gln Cys Leu
 385

<210> 5
 <211> 1520
 <212> ADN
 <213> Talaromyces leycettanus

5

<400> 5
 atggtccatc tttcttccct ggccctggct ttggccgccg gctcgcagct gtatgtgatc 60
 catgccatga ctogagaagt gctcccaaaa ctgactccaa gtctcaatct tagtgcccaa 120
 gctgcaggtc ttaacactgc tgccaaagcg attggaaagc tctatttcgg taccgcaacc 180
 gacaaccgag agctgtccga cagcacatac atgcaggaga cggataaacac cgatgatttc 240
 ggccaactca ccccagctaa ctccatgaag gttogctgac atcttagttc cccccccctt 300
 ttgggaatct gcgoggagat atgctgagcc ttcaaaaacta gtgggatgcc accgagccct 360
 ctcagaacac cttcaccttc accaacggtg atcagatcgc aaaccttget aagagcaacg 420
 gtcagatgct gagatgccac aacctggtgt ggtacaacca gttgccagc tggggtaagc 480
 aaccggttct gttaatatca tcagcgtgac cgcacatcgc gtattgcgag gagattggaa 540
 agatttgcaa gctaattgtca ctacagtac cagcggatct tggaccaatg ccacgcttct 600
 tgcggccatg aagaaccaca tcaccaacgt tgtgaccac tacaaggagc agtgctacgc 660
 ttgggatggt gtcaacgaag gtacgtttcg attcggcttc cctcggaccg tatctgcagg 720
 caaaaaggtc aatcaattga caatcgtgat ccccagctct caacgatgat ggcacctacc 780
 gatccaatgt cttctatcag tacatcggcg aggcatacat tcccattgcc tttgcgaccg 840
 ctgccgccgc cgatccaaac gcgaagctct actacaacga ctacaacatt gaggaccccg 900
 gcgccaaggc caccgcccgc cagaacatcg tcaagatggt caaggcttac ggcgcgaaaa 960
 tcgacggtgt cggctctgcaa tctcacttca tcggtggcag caccctagc cagagctccc 1020
 agcagagcaa catggctgct ttcaccgagc tcggcgtcga ggtcgccatc accgaactgg 1080
 atatccgcat gacgttgct tccaccagtg ctctcttggc ccagcaatcc accgattacc 1140
 agagcactgt gtcggcttgc gtgaacactc cgaagtgcac tggatcacc ctctgggact 1200

10

ES 2 586 307 T3

ggaccgacaa gtactcctgg gttcccaaca ctttctcgg ccaaggtgac gctgcccct 1260
 gggattctaa ctaccagaag aagcctgcct actacggtat cttgactgcg ctcgaggca 1320
 gcgcttcac ctccaccacc accactctgg tgacctccac caggacttog actacgacca 1380
 gcacttcggc cacctccacg tctactggcg ttgctcagca ctggggccag tgcggtgta 1440
 tcggctggac agggccgact acctgcgcta gccctacac ctgccaggaa ctgaatccct 1500
 actactacca gtgcctgtaa 1520

<210> 6
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Talaromyces leycettanus

5

<400> 6
 Met Val His Leu Ser Ser Leu Ala Leu Ala Leu Ala Ala Gly Ser Gln
 1 5 10 15
 Leu Ala Gln Ala Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys
 20 25 30
 Leu Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp Ser Thr
 35 40 45
 Tyr Met Gln Glu Thr Asp Asn Thr Asp Asp Phe Gly Gln Leu Thr Pro
 50 55 60
 Ala Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Asn Thr Phe
 65 70 75 80
 Thr Phe Thr Asn Gly Asp Gln Ile Ala Asn Leu Ala Lys Ser Asn Gly
 85 90 95
 Gln Met Leu Arg Cys His Asn Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu Pro Ser
 100 105 110
 Trp Val Thr Ser Gly Ser Trp Thr Asn Ala Thr Leu Leu Ala Ala Met
 115 120 125
 Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Gln Cys Tyr
 130 135 140
 Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr Tyr Arg
 145 150 155 160
 Ser Asn Val Phe Tyr Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro Ile Ala
 165 170 175

10

ES 2 586 307 T3

Phe Ala Thr Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Tyr Asn
 180 185 190

Asp Tyr Asn Ile Glu Tyr Pro Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala Gln Asn
 195 200 205

Ile Val Lys Met Val Lys Ala Tyr Gly Ala Lys Ile Asp Gly Val Gly
 210 215 220

Leu Gln Ser His Phe Ile Val Gly Ser Thr Pro Ser Gln Ser Ser Gln
 225 230 235 240

Gln Ser Asn Met Ala Ala Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val Ala Ile
 245 250 255

Thr Glu Leu Asp Ile Arg Met Thr Leu Pro Ser Thr Ser Ala Leu Leu
 260 265 270

Ala Gln Gln Ser Thr Asp Tyr Gln Ser Thr Val Ser Ala Cys Val Asn
 275 280 285

Thr Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Leu Trp Asp Trp Thr Asp Lys Tyr
 290 295 300

Ser Trp Val Pro Asn Thr Phe Ser Gly Gln Gly Asp Ala Cys Pro Trp
 305 310 315 320

Asp Ser Asn Tyr Gln Lys Lys Pro Ala Tyr Tyr Gly Ile Leu Thr Ala
 325 330 335

Leu Gly Gly Ser Ala Ser Thr Ser Thr Thr Thr Thr Leu Val Thr Ser
 340 345 350

Thr Arg Thr Ser Thr Thr Thr Ser Thr Ser Ala Thr Ser Thr Ser Thr
 355 360 365

Gly Val Ala Gln His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly
 370 375 380

Pro Thr Thr Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Glu Leu Asn Pro Tyr
 385 390 395 400

Tyr Tyr Gln Cys Leu
 405

<210> 7
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 586 307 T3

<220>
 <223> Cebador PCR
 5 <400> 7
 Acacaactgg ggatccacca tggccatct ttctccctg gcc 43
 <210> 8
 <211> 44
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 15 <400> 8
 Ccctctagat ctcgagttac aggcactggt agtagtagg attc 44
 <210> 9
 <211> 40
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 25 <400> 9
 Acacaactgg ggatccacca tggccgtct tccgctgga 40
 <210> 10
 <211> 41
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 35 <400> 10
 Ccctctagat ctcgagttac aagcactggg agtaccactg g 41
 <210> 11
 <211> 41
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 45 <400> 11
 Acacaactgg ggatccacca tgcgtttctc cttggccact g 41
 <210> 12
 <211> 36
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 55 <400> 12
 Ccctctagat ctcgagctag cagacgctgc aggct 36

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de xilanasa, seleccionado del grupo consistente en:
- 5 (a) un polipéptido con 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% en identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con 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% en identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID
- 10 n.º: 1 o la secuencia de ADNc de la misma;
- (c) una variante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o varias posiciones, donde el número no es más de 10; y
- (d) un fragmento del polipéptido de (a); (b), o (c) que tiene actividad de xilanasa y donde un fragmento significa un fragmento que contiene al menos residuos de aminoácidos 18-364 de SEC ID n.º: 2.
- 15
2. Polipéptido según la reivindicación 1, con 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% en identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
- 20
3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que se codifica por un polinucleótido con 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% en identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADNc de la misma.
- 25
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende o consiste en SEC ID n.º: 2 o el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
5. Polipéptido según la reivindicación 4, donde el polipéptido maduro es los aminoácidos 18 a 364 de SEC ID n.º: 2.
- 30
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es una variante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o no más de 10 posiciones.
7. Polipéptido según la reivindicación 1, que es un fragmento de SEC ID n.º: 2, donde el fragmento tiene actividad de xilanasa.
- 35
8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que se codifica por el polinucleótido contenido en la cepa de *Talaromyces leycettanus* CBS398.68.
9. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 40
10. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 10 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 45
12. Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 10 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
- 50
13. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende:
- (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- (b) recuperación del polipéptido.
- 55
14. Método para producir un polipéptido con actividad de xilanasa, que comprende:
- (a) cultivo de la célula huésped según la reivindicación 12 en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- (b) recuperación del polipéptido.
- 60
15. Planta, parte de planta o célula vegetal transgénicas que comprenden como transgen un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 65
16. Método para producir un polipéptido con actividad de xilanasa, que comprende:
- (a) cultivo de la planta o célula vegetal transgénica según la reivindicación 15 en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- (b) recuperación del polipéptido.

- 5
17. Proceso para la degradación 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 presencia del polipéptido con actividad de xilanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 10
18. Proceso para producir un producto de fermentación, que comprende:
(a) sacarificación de un material celulósico o material que contiene xilano con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad de xilanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
(b) fermentación del material celulósico sacarificado o material que contiene xilano con uno o varios microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y
(c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.
- 15
19. Proceso para la fermentación de un material celulósico o material que contiene xilano, que comprende:
fermentar el material celulósico o material que contiene xilano con uno o varios microorganismos fermentadores, donde el material celulósico o material que contiene xilano se sacarifica con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad de xilanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.