

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 039**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2013 PCT/US2013/072572**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14088934**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2013 E 13811686 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2929022**

54 Título: **Composiciones y métodos de uso**

30 Prioridad:

07.12.2012 WO PCT/CN2012/086162

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

29.05.2017

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es:

**HUA, LING;
LAU, ROSALYN;
LE, STEVEN;
QIAN, ZHEN y
YU, ZHEYONG**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 614 039 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

Composiciones y métodos de uso

Campo técnico

- 5 **[0001]** Las presentes composiciones y métodos se refieren a una beta-mananasa derivada de *Paenibacillus kribbensis*, polinucleótidos que codifican la beta-mananasa, y métodos para la producción y el uso de los mismos. Las formulaciones que contienen la beta-mananasa recombinante tienen una gran variedad de usos, por ejemplo, en la hidrólisis de determinados materiales lignocelulósicos del tipo madera blanda y/o sustratos de biomasa lignocelulósica que comprenden galactoglucomanano (GGM) y/o glucomanano (GM).

Antecedentes

- 10 **[0002]** La celulosa y la hemicelulosa son los materiales vegetales producidos por fotosíntesis más abundantes. Pueden ser degradados y utilizados como fuente de energía por numerosos microorganismos (p. ej., bacterias, levaduras y hongos) que producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar los sustratos poliméricos a azúcares monoméricos (Aro *et al.*, (2001) J. Biol. Chem., 276: 24309-24314). A medida que se aproximan los límites de los recursos no renovables, el potencial de la celulosa para convertirse en una fuente de energía
15 renovable principal es enorme (Krishna *et al.*, (2001) Bioresource Tech., 77: 193-196). La utilización efectiva de celulosa a través de procesos biológicos es un enfoque para superar la escasez de alimentos, piensos y combustibles (Ohmiya *et al.*, (1997) Biotechnol. Gen. Engineer Rev., 14: 365-414).

- [0003]** La mayoría de las hidrólisis enzimáticas de materiales de biomasa lignocelulósica se centran en
20 celulosas, que son enzimas que hidrolizan celulosa (comprendiendo enlaces beta-1,4-glucanos o beta D-glucosídicos) lo que tiene como resultado la formación de glucosa, celobiosa, celooligosacáridos, y similares. Tradicionalmente, las celulosas se han dividido en tres clases principales: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) ("EG"), exoglucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) ("CBH") y beta-glucosidasas ([beta]-D-glucósido glucohidrolasa; EC 3.2.1.21) ("BG") (Knowles *et al.*, (1987) TIBTECH 5: 255-261; y Schulein, (1988) Methods Enzymol., 160: 234-243). Las endoglucanasas actúan principalmente en las partes amorfas de la fibra de
25 celulosa, mientras que las celobiohidrolasas también son capaces de degradar celulosa cristalina (Nevalainen and Penttila, (1995) Mycota, 303-319). En consecuencia, la presencia de una celobiohidrolasa en un sistema de celulosa es necesaria para una solubilización eficiente de celulosa cristalina (Suurnakki *et al.*, (2000) Cellulose, 7: 189-209). La beta-glucosidasa actúa para liberar unidades de D-glucosa de la celobiosa, los celo-oligosacáridos, y otros glucósidos (Freer, (1993) J. Biol. Chem., 268: 9337-9342).

- 30 **[0004]** No obstante, con el fin de obtener azúcares fermentables útiles a partir de materiales de biomasa lignocelulósica, típicamente la lignina necesitará ser permeabilizada en primer lugar, por ejemplo, mediante varios métodos de pretratamiento; y la hemicelulosa, alterada para permitir el acceso a la celulosa por las
35 celulosas. Las hemicelulosas tienen una estructura química compleja y sus principales cadenas se componen de mananos, xilanos y galactanos. Los polisacáridos del tipo manano se encuentran en una variedad de plantas y tejidos vegetales, por ejemplo, en semillas, raíces, bulbos y tubérculos de plantas. Dichos sacáridos pueden incluir mananos, galactomananos y glucomananos, que contienen típicamente cadenas lineales e intercaladas de unidades de galactosa y/o unidades de manosa lineares con enlaces beta-1,4. La mayoría de los tipos de mananos no son solubles en agua, formando la dureza característica de determinados tejidos vegetales como las nueces de palma y el marfil vegetal. Por otra parte, los galactomananos tienden a ser solubles en agua y se
40 encuentran en el endospermo de las semillas de plantas leguminosas, y se piensa que ayudan a la retención de agua en dichas semillas.

- [0005]** La hidrólisis enzimática de la estructura lignocelulósica compleja y las paredes de las células vegetales bastante recalcitrantes conlleva las acciones concertadas y/o en tándem de un número de distintas endoenzimas y exoenzimas (p. ej., celulosas y hemicelulasas). Las beta-xilanasas y las beta-mananasas son endoenzimas; las
45 beta-manosidasas, las beta-glucosidasas y las alfa-galactosidasas son exoenzimas. Para alterar la hemicelulosa, pueden aplicarse xilanasas junto con otras proteínas accesorias (algunos ejemplos no limitativos de las mismas incluyen L- α -arabinofuranosidasas, feruloil y acetil xilano esterases, glucuronidasas y β -xilosidasas).

- [0006]** Las endo-1,4-beta-D-mananasas (E.C. 3.2.1.78) catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces beta-1,4-manosídicos en la cadena principal de manano, galactomanano y galactoglucomanano, liberando oligomanósidos de cadena larga y corta. Los oligomanósidos de cadena corta pueden incluir manobiosa y manotriosa, aunque en ocasiones también pueden incluir manosa. Estos también pueden ser hidrolizados por beta-manosidasas (E.C.3.2.1.25). Además, los azúcares de cadena lateral de heteropolisacáridos también pueden ser hidrolizados, por ejemplo, hasta su finalización, por alfa-galactosidasa, beta-glucosidasa, y/o acetil manan esterases. Puls J., (1997) Macromol. Symp. 120:183-196.

[0007] Las beta-mananasas se han aislado de bacterias, hongos, plantas y animales. Véase Araujo A. *et al.*, (1990) J. App. Bacteriol. 68:253-261; Dutta S. *et al.*, (1997) Plant Physiol. 113:155-161; Puchar V. *et al.*, (2004) Biochim. Biophys. Acta 1674:239-250. Los genes que codifican estas enzimas a partir de un número de organismos también se han clonado y secuenciado; muchos, si no todos, también han sido clasificados como miembros de la familia 5 o 26 de glucósido hidrolasa (GH), según sus secuencias. Véase, p. ej., Bewley D.J., (1997) Planta 203:454-459; Halstead J.R. *et al.*, (2000) FEMS Microl. Lett. 192:197-203; Xu B. *et al.*, (2002) Eur. J. Biochem. 269:1753-1760; Henrissat, B. (1991) Biochem. J. 280:309-316. Aunque la mayoría de las beta-mananasas son secretadas por los organismos de los que se originan, se sabe que algunas se asocian con las células. De un determinado organismo, puede haber más de una mananasa con distintos puntos isoeléctricos derivados de distintos genes o distintos productos de los mismos genes, hecho que, según se piensa, constituye un indicio de la importancia de estas enzimas.

[0008] Las beta-mananasas se han utilizado en aplicaciones comerciales en, por ejemplo, industrias como la industria del papel y la pulpa, la industria de la alimentación y de los piensos, la industria farmacéutica y la industria energética. Lee J.T., *et al.*, (2003) Poult. Sci. 82:1925-1931; McCutchen M.C., *et al.*, (1996) Biotechnol. Bioeng. 52:332-339; Suurnakki A., *et al.*, (1997) Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 57:261-287. Sin embargo, dependiendo de los microorganismos a partir de los que se derivan las mananasas, distintas mananasas pueden tener distintas propiedades y perfiles de actividad que las hagan más adecuadas para una o más aplicaciones industriales, pero no para otras. La hidrólisis de sustratos de biomasa lignocelulósica, especialmente aquellos procedentes de fuentes vegetales, es notoriamente difícil, por lo tanto pocas mananasas, o ninguna, que han resultado ser útiles en otras aplicaciones industriales han sido utilizadas para hidrolizar materiales lignocelulósicos.

[0009] En consecuencia, existe una necesidad de identificar mananasas y/o composiciones que comprendan tales enzimas que, en conjunto con celulasas comerciales, recién identificadas o modificadas y otras hemicelulasas, sean efectivas y capaces de convertir una gran variedad de materiales de origen vegetal y/u otros materiales celulósicos o hemicelulósicos en azúcares fermentables con una eficacia suficiente o mejorada, producciones de azúcares fermentables mejoradas y/o una capacidad mejorada para actuar en una mayor variedad de materia prima celulósica. La producción de nuevas mananasas utilizando microbios modificados también es importante y deseable porque estos son medios a través de los que se puede elaborar enzimas de forma rentable.

30 Sumario

[0010] La presente invención se refiere al uso de una beta-mananasa muy activa aislada de la cepa de la especie bacteriana *Paenibacillus kribbensis* para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica. La secuencia de SEQ ID NO:2 descrita en el presente documento se presentó en 2012 ante el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, que la publicó ese mismo año con el número de registro ZP_09776462, y se designó como una enzima de familia 5 de glucósido hidrolasa con una función desconocida, derivada de la bacteria endofítica *Paenibacillus sp.* Aloe-11. Hasta la fecha, esta enzima no ha sido designada como una beta-mananasa y no ha sido expresada de forma recombinante, en una cantidad industrial o comercial relevante, ni ha sido aplicada en aplicaciones industriales. Los polipéptidos Pkr Man3 no han sido expresados por un microorganismo modificado. Tampoco han sido coexpresados con uno o más genes de celulasa y/o una o más hemicelulasas, ni han sido incluidos en una composición con los mismos.

[0011] Es relevante para la presente invención el descubrimiento de que los polipéptidos que tienen al menos un 55 % (p. ej., al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o más) de identidad con SEQ ID NO:2, o con la secuencia madura de SEQ ID NO:3, que son los residuos 35-334 de SEQ ID NO:2, tienen actividad de beta-mananasa. Además, cuando se combina tal polipéptido con una o más celulasas y/o una o más otras hemicelulasas, este confiere una capacidad mejorada de esa composición o mezcla para hidrolizar sustratos de biomasa lignocelulósica. Tales mejoras incluyen, por ejemplo, una o más de las propiedades seleccionadas de: una conversión de glucano incrementada, una producción de glucosa incrementada a partir de un sustrato de biomasa determinado, una conversión de xilano incrementada, una producción de xilosa incrementada, una producción de azúcar soluble total incrementada a partir de un sustrato de biomasa determinado, una licuefacción más rápida de un sustrato de biomasa determinado en un nivel de sólidos, y una reducción más rápida de la viscosidad de un sustrato de biomasa en un nivel de sólidos. Las mejoras también pueden incluir el hallazgo sorprendente de que tal polipéptido puede utilizarse para impulsar la conversión y la hidrólisis de biomasa celulósica cuando se combina con una mezcla o composición de celulasa, que de forma opcional comprende además una o más otras hemicelulasas. La mezcla resultante que comprende el polipéptido Pkr Man3 tiene un rendimiento de hidrólisis mejorado en comparación con una mezcla homóloga que tenga todas las otras enzimas en las mismas

concentraciones/proporciones/cantidades, pero sin el Pkr Man3. En algunos modos de realización, los polipéptidos Pkr Man3 pueden sustituir, por ejemplo, hasta aproximadamente un 20 % en peso (p. ej., hasta aproximadamente un 20 % en peso, hasta aproximadamente un 18 % en peso, hasta aproximadamente un 16 % en peso, hasta aproximadamente un 14 % en peso, hasta aproximadamente un 12 % en peso, hasta aproximadamente un 10 % en peso, hasta aproximadamente un 8 % en peso, hasta aproximadamente un 5 % en peso, etc.) de una mezcla o composición de celulasa, y la composición sustituida, cuando se utilice para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado, retendrá su capacidad y rendimiento de hidrólisis, o incluso tendrá una hidrólisis mejorada (p. ej., mayor conversión de glucano y/o xilano, mayor producción de azúcares totales, licuefacción más rápida, y/o reducción de la viscosidad mejorada) que una mezcla o composición de celulasa homóloga no sustituida de, por lo demás, la misma composición de enzimas y la misma proteína total.

[0012] En consecuencia, la invención proporciona una composición de enzimas que comprende un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, donde el polipéptido tiene actividad de beta-mananasa, y una o más celulastas, o una o más otras hemicelulastas.

[0013] La composición de enzimas puede comprender además un sustrato de biomasa lignocelulósica.

[0014] La invención comprende además un método para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica, que comprende: el contacto de un sustrato de biomasa lignocelulósica con una composición de enzimas de la invención, para producir glucosa y otros azúcares.

[0015] Los materiales de biomasa lignocelulósica especialmente adecuados son aquellos que contienen galactoglucomanano (GGM) y/o glucomanano (GM). Entonces, tales azúcares fermentables pueden convertirse en etanol, combustibles y otros productos bioquímicos y útiles celulósicos. En determinados modos de realización, los polipéptidos de beta-mananasa, cuando se combinaron con una mezcla de enzimas que comprende al menos una celulasa o al menos una otra hemicelulasa, o con una mezcla de enzimas que comprende al menos una celulasa y al menos una otra hemicelulasa, dieron lugar a una mezcla de enzimas que es capaz de una capacidad incrementada o mejorada de hidrolizar un material de biomasa lignocelulósica, en comparación con, por ejemplo, otras beta-mananastas de varios microbios que tienen un pH óptimo similar y/o una temperatura óptima similar.

[0016] Dicha capacidad incrementada o mejorada de hidrolizar un material de biomasa lignocelulósica se refleja, por ejemplo, no solamente en una producción sustancialmente incrementada de azúcares solubles totales, sino sorprendentemente también en una producción de glucosa incrementada (lo que refleja una mayor conversión de glucano) y/o una producción de xilosa incrementada (lo que refleja una mayor conversión de xilano), producidas por la hidrólisis enzimática de un determinado sustrato de biomasa lignocelulósica pretratado de una forma específica.

[0017] La capacidad incrementada o mejorada de hidrolizar un material de biomasa lignocelulósica también puede reflejarse en la capacidad deseable de dicha composición de enzimas de mejorar o acelerar la licuefacción y/o reducir la viscosidad del material de biomasa pretratado. Dicho beneficio relativo a la viscosidad/licuefacción es el más prominente si se utiliza como sustrato un elevado nivel de sólidos del material de biomasa. Los beneficios de viscosidad/licuefacción también son sustanciales e importantes cuando la composición/mezcla de enzimas se utiliza para descomponer o hidrolizar una biomasa leñosa, que tiende a ser altamente fibrosa y recalcitrante, lo que da lugar a materias primas especialmente viscosas.

[0018] La capacidad incrementada o mejorada de hidrolizar una biomasa lignocelulósica permite la sustitución de hasta aproximadamente un 20 % en peso (p. ej., hasta aproximadamente un 20 % en peso, hasta aproximadamente un 18 % en peso, hasta aproximadamente un 16 % en peso, hasta aproximadamente un 14 % en peso, hasta aproximadamente un 12 % en peso, hasta aproximadamente un 10 % en peso, hasta aproximadamente un 8 % en peso, hasta aproximadamente un 5 % en peso, etc.) de cualquier composición de celulasa determinada, que comprende de forma opcional una o más otras hemicelulastas, con un polipéptido Pkr Man3, reduciendo así la cantidad de la composición de celulasa y las enzimas utilizadas en la misma para hidrolizar un sustrato determinado sin sacrificar el rendimiento. De hecho, el rendimiento de la hidrólisis puede incluso mejorarse utilizando la composición sustituida. Reducir la cantidad de la composición de celulasa, así como la cantidad de enzimas requeridas en la misma para hidrolizar o sacarificar una biomasa lignocelulósica tiene como resultado un ahorro de costes sustancial para producir un azúcar celulósico, que puede entonces transformarse en etanol u otros productos útiles y bioquímicos derivados valiosos.

[0019] Las presentes composiciones y métodos emplean beta-mananasa derivada de *Paenibacillus kribbensis*, a la que se hace referencia aquí como "Pkr Man3" o "polipéptidos Pkr Man3", en varias aplicaciones industriales útiles, por ejemplo, para hidrolizar o convertir biomasa lignocelulósica en azúcares solubles fermentables.

Entonces, tales azúcares fermentables pueden convertirse en etanol, combustibles y otros productos bioquímicos y útiles celulósicos. Como se demuestra en el presente documento, los polipéptidos Pkr Man3, así como las composiciones que comprenden polipéptidos Pkr Man3, tienen un rendimiento mejorado cuando se combinan con al menos una celulasa y/o al menos una otra hemicelulasa para hidrolizar sustratos de biomasa lignocelulósica, especialmente aquellos que contienen al menos algunos niveles mensurables de galactoglucomanano (GGM) y/o glucomanano (GM), en comparación con otras beta-mananasas procedentes de microorganismos similares que tienen pH óptimos y/o temperaturas óptimas similares. El rendimiento mejorado puede radicar en que los polipéptidos Pkr Man3 y/o las composiciones de enzimas que comprenden polipéptidos Pkr Man3 produzcan cantidades incrementadas de azúcares solubles totales cuando se utilicen para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica en condiciones adecuadas para la hidrólisis enzimática, en comparación con otras beta-mananasas microbianas que tienen pH óptimos y/o temperaturas óptimas similares. De forma sorprendente, los polipéptidos Pkr Man3 y/o las composiciones que comprenden dichos polipéptidos también tienen una conversión de glucano mejorada y/o una conversión de xilano mejorada, en comparación con aquellas otras beta-mananasas microbianas que tienen pH óptimos y/o temperaturas óptimas similares. El rendimiento mejorado puede radicar, de forma alternativa o adicional, en que los polipéptidos Pkr Man3 y/o las composiciones de enzimas que comprenden polipéptidos Pkr Man3 confieren una rápida reducción de viscosidad/licuefacción al sustrato de biomasa, de forma que se mejora la hidrólisis general no solamente en efectividad, sino también en eficiencia.

[0020] En algunos modos de realización, se aplica un polipéptido Pkr Man3 junto con una o más celulastas, o en presencia de las mismas, en una composición de enzimas para hidrolizar o descomponer un sustrato de biomasa adecuado. La una o más celulastas pueden ser, por ejemplo, una o más beta-glucosidasas, celobiohidrolasas y/o endoglucanasas. Por ejemplo, la composición de enzimas puede comprender un polipéptido Pkr Man3, una beta-glucosidasa, una celobiohidrolasa, y una endoglucanasa. En algunos modos de realización, al menos una de las celulastas es heteróloga al Pkr Man3, ya que al menos una de las celulastas no se deriva de un *Paenibacillus kribbensis*. En algunos modos de realización, al menos dos entre las celulastas son heterólogas entre sí.

[0021] En algunos modos de realización, se aplica un polipéptido Pkr Man3 junto con una o más otras hemicelulasas, o en presencia de las mismas, en una composición de enzimas. La una o más otras hemicelulasas pueden ser, por ejemplo, otras mananasas, xilanasas, beta-xilosidasas y/o L-arabinofuranosidasas. En algunos modos de realización, al menos una de las otras hemicelulasas es heteróloga al Pkr Man3, ya que al menos una de las otras hemicelulasas, que pueden ser seleccionadas de una o más otras mananasas, xilanasas, beta-xilosidasas y/o L-arabinofuranosidasas, no se deriva de un *Paenibacillus kribbensis*. En determinados modos de realización, al menos dos de las otras hemicelulasas son heterólogas entre sí.

[0022] En otros modos de realización, se aplica el polipéptido Pkr Man3 junto con una o más celulastas y una o más otras hemicelulasas, o en presencia de las mismas, en una composición de enzimas. Por ejemplo, la composición de enzimas comprende un polipéptido Pkr Man3, ninguna o una o dos otras mananasas, una o más celobiohidrolasas, una o más endoglucanasas, una o más beta-glucosidasas, ninguna o una o más xilanasas, ninguna o una o más beta-xilosidasas, y ninguna o una o más L-arabinofuranosidasas.

[0023] En algunos modos de realización, se utiliza un polipéptido Pkr Man3 para sustituir hasta aproximadamente un 20 % en peso (sobre la base del peso total de las proteínas en una composición) (p. ej., hasta aproximadamente un 20 % en peso, hasta aproximadamente un 18 % en peso, hasta aproximadamente un 16 % en peso, hasta aproximadamente un 14 % en peso, hasta aproximadamente un 12 % en peso, hasta aproximadamente un 10 % en peso, hasta aproximadamente un 8 % en peso, hasta aproximadamente un 5 % en peso, etc.) de una composición de enzimas que comprende una o más celulastas, opcionalmente también una o más otras hemicelulasas sin Pkr Man3. En algunos modos de realización, la composición de enzimas así sustituida tiene un rendimiento de sacarificación similar o mejorado con respecto a la composición de enzimas homóloga no sustituida que no tiene Pkr Man3 presente, sino todas las otras celulastas y/o hemicelulasas, así como el mismo peso total de proteínas en la composición. En algunos modos de realización, la composición de enzimas sustituida puede producir la misma cantidad de glucosa y/o xilosa, o una cantidad aproximadamente un 5 % más elevada de glucosa y/o xilosa, una cantidad aproximadamente un 7 % más elevada de glucosa y/o xilosa, una cantidad aproximadamente un 10 % más elevada de glucosa y/o xilosa, o una cantidad incluso mayor de glucosa y/o xilosa a partir del mismo sustrato de biomasa lignocelulósica, en comparación con la composición de enzimas homóloga no sustituida que no tiene Pkr Man3, sino todas las otras celulastas y/o hemicelulasas, y que comprende el mismo peso total de proteínas en la composición. En algunos modos de realización, cuando se utiliza para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado en un determinado nivel de sólidos, la composición de enzimas sustituida reduce la viscosidad del sustrato de biomasa en la misma medida o en mayor medida, en comparación con la composición de enzimas homóloga no sustituida que no comprende Pkr Man3, sino todas las otras celulastas y/o hemicelulasas, y que comprende el mismo peso total de proteínas en la composición.

[0024] En determinados modos de realización, se aplica una composición que comprende el polipéptido Pkr Man3 a un sustrato de biomasa lignocelulósica o a un sustrato de biomasa lignocelulósica hidrolizado parcialmente en presencia de un microbio etanológeno, que es capaz de metabolizar los azúcares fermentables solubles producidos por la hidrólisis enzimática del sustrato de biomasa lignocelulósica y de convertir dichos azúcares en etanol, productos bioquímicos u otros materiales útiles. Dicho proceso puede ser un proceso estrictamente secuencial en el que la fase de hidrólisis ocurre antes de la fase de fermentación. Dicho proceso puede, de forma alternativa, ser un proceso híbrido, en el que la fase de hidrólisis comienza primero pero, por un período, se solapa con el proceso de fermentación, que comienza más tarde. Dicho proceso puede, en otra alternativa, ser un proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas, en el que la hidrólisis enzimática del sustrato de biomasa ocurre mientras los azúcares producidos a partir de la hidrólisis enzimática son fermentados por el etanológeno.

[0025] El polipéptido Pkr Man3, por ejemplo, puede ser parte de una composición de enzimas, que es un producto de caldo completo de un microbio modificado capaz de expresar o sobreexpresar dicho polipéptido en condiciones adecuadas. En determinados modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 puede ser modificado genéticamente para expresarse en una célula huésped bacteriana, por ejemplo, en *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, o *Streptomyces*. En determinados modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 puede ser modificado genéticamente para expresarse en una célula huésped fúngica, por ejemplo, en una célula huésped de cualquiera de las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycotina*. En consecuencia, las células huésped fúngicas filamentosas pueden incluir, sin carácter limitativo, células de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Corynascus*, *Chaetomium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Mucor*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Scytalidium*, *Schizophyllum*, *Sporotrichum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypoeladium*, *Trametes* y *Trichoderma*.

[0026] El microbio modificado que expresa o sobreexpresa el polipéptido Pkr Man3 también puede expresar y/o secretar una o más o todas de una o más celulasas y opcionalmente también una o más otras hemicelulasas. La una o más celulasas pueden ser seleccionadas de, por ejemplo, una o más endoglucanasas, una o más beta-glucosidasas, y/o una o más celobiohidrolasas. La una o más otras hemicelulasas pueden ser seleccionadas de, por ejemplo, una o más otras beta-mananasas, una o más Alfa-L-arabinofuranosidasas, una o más xilanasas, y/o una o más beta-xilosidasas. La mezcla de enzimas resultante que comprende el polipéptido Pkr Man3 es una "mezcla de enzimas coexpresada" a efectos de la presente memoria.

[0027] En otro modo de realización, el microbio modificado que expresa o sobreexpresa el polipéptido Pkr Man3 puede ser uno que sea diferente del uno o más otros microbios que expresan una o más de las celulasas y/o una o más de las otras hemicelulasas. La una o más celulasas pueden ser seleccionadas de, por ejemplo, una o más endoglucanasas, una o más beta-glucosidasas, y/o una o más celobiohidrolasas. La una o más otras hemicelulasas pueden ser seleccionadas de, por ejemplo, una o más otras beta-mananasas, una o más Alfa-L-arabinofuranosidasas, una o más xilanasas, y/o una o más beta-xilosidasas. Por consiguiente, el polipéptido Pkr Man3 puede combinarse con una o más celulasas y/o una o más otras hemicelulasas para formar una composición/mezcla de enzimas, que es una "mezcla física" o "adición" de Pkr Man3 y otros polipéptidos. La capacidad mejorada observable o factible con la mezcla de enzimas coexpresada también es observable o factible con la adición que comprende Pkr Man3.

[0028] Como se demuestra en el presente documento, las composiciones que comprenden polipéptidos Pkr Man3 han mejorado la eficacia y las condiciones en las que tienen lugar la sacarificación y la degradación de biomasa lignocelulósica. La eficacia mejorada de una composición de enzimas que comprende un polipéptido Pkr Man3 se muestra cuando su rendimiento de hidrólisis de un sustrato de biomasa determinado se compara con el de una composición de enzimas comparable por lo demás que comprende determinadas otras beta-mananasas microbianas que tienen pH óptimos y/o temperaturas óptimas similares. En determinados modos de realización, los polipéptidos Pkr Man3 de las composiciones y los métodos aquí expuestos tienen una capacidad incrementada en al menos aproximadamente un 5 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 7 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 12 %, al menos aproximadamente un 13 %, al menos aproximadamente un 14 %, al menos aproximadamente un 15 %, o más) para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado, que de forma opcional ha sido sometido a pretratamiento, en comparación con un polipéptido BamGh8 de *Bacillus hemicellulosilyticus* que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o un polipéptido Gte Man1 de *Geobacillus tepidamans*, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5. El rendimiento de la hidrólisis de un sustrato de biomasa determinado puede medirse utilizando la cantidad de azúcares solubles totales producidos a partir de una biomasa lignocelulósica determinada en un conjunto de condiciones de sacarificación determinado. El rendimiento de la hidrólisis de un sustrato de biomasa determinado también puede medirse utilizando la cantidad de glucosa producida a partir de un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado en una condición de sacarificación o el % de conversión de glucano a partir de dicho sustrato de biomasa. Por ejemplo, el % de

conversión de glucano puede evaluarse utilizando un método descrito en el Ejemplo 9 (en el presente documento). Como tal, un polipéptido Pkr Man3, cuando se incluye en una determinada composición de enzimas en una cantidad determinada, puede conferir al menos un incremento del 5 % (por ejemplo, un incremento del 5 %, un incremento de un 7 %, un incremento de un 10 %, un incremento de un 11 %, un incremento de un 12 %, un incremento de un 13 %, un incremento de un 14 %, un incremento de un 15 %, o un incremento de un mayor porcentaje) en el % de conversión de glucano cuando es parte de una composición de enzimas en comparación con la, por lo demás, misma composición de enzimas que comprende la misma cantidad de BamGh8, o la misma cantidad de Gte Man1, en las mismas condiciones de hidrólisis. De forma alternativa o adicional, el rendimiento de la hidrólisis de un sustrato de biomasa determinado puede medirse utilizando la cantidad de xilosa producida a partir de un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado en una condición de sacarificación o el % de conversión de xilano a partir de dicho sustrato. Por ejemplo, el % de conversión de xilano puede evaluarse utilizando un método descrito en el Ejemplo 9 (en el presente documento). Como tal, un polipéptido Pkr Man3, cuando se incluye en una determinada composición de enzimas en una cantidad determinada, puede conferir al menos un incremento de un 5 % (por ejemplo, un incremento de un 5 %, un incremento de un 7 %, un incremento de un 10 %, un incremento de un 11 %, un incremento de un 12 %, un incremento de un 13 %, un incremento de un 14 %, un incremento de un 15 %, o un incremento de un mayor porcentaje) en el % de conversión de xilano cuando es parte de una composición de enzimas en comparación con la, por lo demás, misma composición de enzimas que comprende la misma cantidad de BamGh8, o la misma cantidad de Gte Man1, en las mismas condiciones de hidrólisis.

[0029] Además, el rendimiento de la hidrólisis de un sustrato de biomasa determinado también puede medirse mediante el grado o la medida de reducción de la viscosidad o licuefacción del sustrato de biomasa, o la velocidad de dicha reducción de la viscosidad o licuefacción de un determinado sustrato con un nivel de sólidos particular. La reducción de la viscosidad y/o licuefacción y el índice de las mismas pueden evaluarse utilizando un método descrito en el Ejemplo 10 (en el presente documento). Como tal, un polipéptido Pkr Man 3, cuando se incluye en una determinada composición de enzimas en una cantidad determinada, puede conferir al menos una reducción de la viscosidad o un nivel de licuefacción al menos un 5 % mayor en comparación con una, por lo demás, misma composición de enzimas que comprende la misma cantidad de BamGh8, o la misma cantidad de Gte Man1, en las mismas condiciones de hidrólisis y después de que se continúe la reacción de hidrólisis durante el mismo período de tiempo.

[0030] Las presentes composiciones y métodos emplean un polipéptido Pkr Man 3 recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, donde el polipéptido tiene actividad de beta-mananasa. En algunos aspectos, el polipéptido Pkr Man3 es (a) derivado, obtenible o producido a partir de *Paenibacillus kribbensis*, por ejemplo, una bacteria endofítica *Paenibacillus sp. Aloe-11*; (b) un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % (p. ej., al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % (p. ej., al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 %) idéntica al dominio catalítico de de SEQ ID NO:2, a saber los residuos de aminoácidos 35 a 334; (d) un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % (p. ej., al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 %) idéntica a la fórmula madura de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, a saber los residuos de aminoácidos 35 a 334 de SEQ ID NO:2; o (e) un fragmento de (a), (b), (c) o (d) que tiene actividad de beta-mananasa. En determinados modos de realización, se proporciona una variante de polipéptido que tiene actividad de beta-mananasa, que comprende una sustitución, una delección y/o una inserción de uno o más residuos de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3. En determinados modos de realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 3. En determinados modos de realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 3. En determinados modos de realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 3. En determinados modos de realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO: 3.

[0031] En determinados modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 tiene un pH óptimo de aproximadamente pH 5.0. El polipéptido Pkr Man3 retiene más de un 70 % de su actividad máxima entre pH 2.8 y pH 7.6.

[0032] En determinados modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 tiene una temperatura óptima de aproximadamente 64 °C. El polipéptido Pkr Man3 retiene más de un 80 % de su actividad máxima entre las temperaturas de 40 °C and 68 °C.

[0033] En determinados modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 tiene una buena termoestabilidad. Por ejemplo, el polipéptido Pkr Man3 retiene aproximadamente el 50 % de su actividad de beta-mananasa cuando se incuba durante aproximadamente dos horas a una temperatura de aproximadamente 82 °C. En determinados modos de realización, el polipéptido retiene al menos un 99 % de la actividad de beta-mananasa cuando se incuba durante aproximadamente dos horas a una temperatura inferior a 60 °C.

[0034] Como se demuestra en el presente documento, los polipéptidos Pkr Man3 aquí descritos pueden conferir, a una mezcla o composición de enzimas que comprende una o más celulasas, una capacidad mejorada de hidrolizar, sacarificar o degradar un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado, que opcionalmente ha sido sometido a pretratamiento, y en el que además opcionalmente algunos de sus componentes que contienen xilano se han eliminado o separado de los componentes que contienen glucano. Dicha capacidad mejorada de hidrolizar, sacarificar o degradar un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado puede evidenciarse mediante un % de conversión de glucano considerablemente más elevado obtenido utilizando una composición de enzimas determinada que comprende al menos una celulasa, y un polipéptido Pkr Man3 en una cantidad máxima de aproximadamente un 20 % en peso (por ejemplo, hasta aproximadamente un 2 % en peso, hasta aproximadamente un 5 % en peso, hasta aproximadamente un 7 % en peso, hasta aproximadamente un 10 % en peso, hasta aproximadamente un 12 % en peso, hasta aproximadamente un 15 % en peso, hasta aproximadamente un 16 % en peso, hasta aproximadamente un 17 % en peso, hasta aproximadamente un 18 % en peso, hasta aproximadamente un 19 % en peso, hasta aproximadamente un 20 % en peso) de la composición de enzimas, para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica concreto, en comparación con una composición de enzimas homóloga que comprende todas las mismas otras enzimas en la misma proporción pero no comprende polipéptidos Pkr Man3.

[0035] De forma alternativa o adicional, los polipéptidos Pkr Man3 aquí descritos pueden conferir, a una mezcla o composición de enzimas que comprende una o más otras hemicelulasas, una capacidad mejorada de hidrolizar, sacarificar o degradar un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado, que opcionalmente ha sido sometido a pretratamiento, y en el que además opcionalmente algunos de sus componentes que contienen xilano se han eliminado o separado de los componentes que contienen glucano. Dicha capacidad mejorada de hidrolizar, sacarificar o degradar un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado puede evidenciarse mediante un % de conversión de xilano considerablemente más elevado obtenido utilizando una composición de enzimas determinada que comprende al menos una otra hemicelulasa, y un polipéptido Pkr Man3 en una cantidad máxima de aproximadamente un 20 % en peso (por ejemplo, hasta aproximadamente un 2 % en peso, hasta aproximadamente un 5 % en peso, hasta aproximadamente un 7 % en peso, hasta aproximadamente un 10 % en peso, hasta aproximadamente un 12 % en peso, hasta aproximadamente un 15 % en peso, hasta aproximadamente un 16 % en peso, hasta aproximadamente un 17 % en peso, hasta aproximadamente un 18 % en peso, hasta aproximadamente un 19 % en peso, hasta aproximadamente un 20 % en peso) de la composición de enzimas, para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica que contiene xilano o un componente que contiene xilano derivado del mismo, en comparación con una composición de enzimas homóloga que comprende todas las mismas otras enzimas en la misma proporción pero no comprende polipéptidos Pkr Man3.

[0036] La biomasa lignocelulósica adecuada puede derivarse, por ejemplo, de un cultivo agrícola, de un producto secundario de una producción de alimentos o piensos, de un residuo lignocelulósico, de un residuo vegetal, lo que incluye, por ejemplo, un residuo de hierba, o un papel residual o un producto de papel residual. Una determinada biomasa especialmente adecuada puede ser una que comprenda al menos un nivel mensurable de galactoglucomanano (GGM) y/o glucomanano (GM). De forma adecuada, la biomasa puede ser preferiblemente una que sea rica en galactoglucomanano (GGM) y/o glucomanano (GM), por ejemplo una que comprenda al menos aproximadamente un 0,5 % en peso (p. ej., un 0,5 % en peso, al menos aproximadamente un 0,7 % en peso, al menos aproximadamente un 1,0 % en peso, al menos aproximadamente un 1,2 % en peso, al menos aproximadamente un 1,5 % en peso, al menos aproximadamente un 2,0 % en peso, al menos aproximadamente un 2,5 % en peso, o más) de GGM, o al menos aproximadamente un 0,5 % en peso (p. ej., un 0,5 % en peso, al menos aproximadamente un 0,7 % en peso, al menos aproximadamente un 1,0 % en peso, al menos aproximadamente un 1,2 % en peso, al menos aproximadamente un 1,5 % en peso, al menos aproximadamente un 2,0 % en peso, al menos aproximadamente un 2,5 % en peso, o más) de GM, o al menos aproximadamente un 0,5 % en peso (p. ej., un 0,5 % en peso, al menos aproximadamente un 0,7 % en peso, al menos aproximadamente un 1,0 % en peso, al menos aproximadamente un 1,2 % en peso, al menos aproximadamente un 1,5 % en peso, al menos aproximadamente un 2,0 % en peso, al menos aproximadamente un 2,5 % en peso, al menos aproximadamente un 3,0 % en peso, al menos aproximadamente un 3,5 % en peso, al menos aproximadamente un 4,0 % en peso, al menos aproximadamente un 4,5 % en peso, al menos aproximadamente un 5,0 % en peso, o más) de GGM y GM combinados. En determinados modos de realización, la biomasa lignocelulósica ha sido sometida a una o más fases de pretratamiento con el fin de hacer el xilano, las hemicelulosas, la celulosa y/o el material de lignina más accesibles o susceptibles a las enzimas y, en consecuencia, más modificables mediante hidrólisis enzimática. Un método de pretratamiento adecuado puede ser, por ejemplo, someter el material de biomasa a un catalizador que comprende una solución diluida de un ácido fuerte y una sal metálica en un reactor. Véase, p. ej., las patentes de los Estados Unidos con número

6,660,506 y 6,423,145. De forma alternativa, un pretratamiento adecuado puede ser, por ejemplo, un procedimiento de múltiples fases como se describe en la patente de los Estados Unidos con número 5,536,325. En determinados modos de realización, el material de biomasa puede ser sometido a una o más etapas de hidrólisis con ácido diluido utilizando entre aproximadamente un 0,4 % y aproximadamente un 2 % de un ácido fuerte, según las exposiciones de la patente de los Estados Unidos con número 6,409,841. Otros ejemplos de métodos de pretratamiento pueden incluir aquellos descritos en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos con número 5,705,369; en Gould, (1984) *Biotech. & Bioengr.*, 26:46-52; en Teixeira *et al.*, (1999) *Appl. Biochem & Biotech.*, 77-79:19-34; en la solicitud de patente internacional publicada WO2004/081185; o en la publicación de patente de los Estados Unidos con número 20070031918, o la solicitud de patente internacional publicada WO06110901. Un ejemplo no limitativo de un sustrato de biomasa lignocelulósica es un sustrato de madera blanda pretratado utilizando el protocolo SPORL del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, como se describe en el ejemplo 10 del presente documento. Otro ejemplo no limitativo de un sustrato de biomasa lignocelulósica adecuado es una pulpa de madera blanda pretratada con KRAFT alcalino FPP-27.

[0037] Los métodos de elaboración o producción de un polipéptido Pkr Man3 que tenga actividad de beta-mananasa pueden emplear una secuencia de ácido nucleico aislado que codifique el polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % idéntica (p. ej., al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 %) a la de SEQ ID NO:2, o a la de la secuencia madura de SEQ ID NO:3. El polipéptido puede comprender además un péptido señal nativo o no nativo para que el polipéptido Pkr Man3 que es producido sea secretado por un organismo hospedador, por ejemplo, el péptido señal comprende una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a cualquiera de SEQ ID NOS:8-36 para permitir la expresión heteróloga en una variedad de células huésped fúngicas, células huésped de levadura y células huésped bacterianas. El ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia que sea al menos un 55 % (p. ej., al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %, o un 100 %) idéntica a SEQ ID NO:1. El ácido nucleico aislado puede comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifique una secuencia de péptido señal. La secuencia de péptido señal puede ser una seleccionada de SEQ ID NOS:8-36. Una secuencia de ácido nucleico que codifique la secuencia de péptido señal de SEQ ID NO:16 o 17 puede utilizarse para expresar un polipéptido Pkr Man3 en *Trichoderma reesei*.

[0038] Aspectos de la presente exposición incluyen un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado como se ha descrito anteriormente en combinación operable con una secuencia reguladora.

[0039] Aspectos de la presente exposición incluyen una célula huésped que comprende el vector de expresión. La célula huésped puede ser una célula bacteriana o una célula fúngica.

[0040] Aspectos de la presente exposición incluyen una composición que comprende la célula huésped descrita anteriormente y un medio de cultivo. Aspectos de la presente exposición incluyen un método de producción de un polipéptido Pkr Man3 que comprende: el cultivo de la célula huésped descrita anteriormente en un medio de cultivo, en condiciones adecuadas para producir la beta-mananasa.

[0041] Aspectos de la presente exposición incluyen una composición que comprende un polipéptido Pkr Man3 en el sobrenadante de un medio de cultivo producido según los métodos de producción de la beta-mananasa descritos anteriormente.

[0042] El polipéptido Pkr Man3 puede ser expresado de forma heteróloga por una célula huésped. Por ejemplo, el polipéptido Pkr Man3 puede ser expresado por un microorganismo modificado que no sea *Paenibacillus kribbensis*. El polipéptido Pkr Man3 puede ser coexpresado con uno o más genes de celulasa o con uno o más otros genes de hemicelulasa.

[0043] En algunos aspectos, se proporcionan composiciones que comprenden los polipéptidos Pkr Man3 recombinantes de los párrafos precedentes y métodos para preparar dichas composiciones. En algunos modos de realización, la composición comprende además una o más celulasas, donde la una o más celulasas son coexpresadas por una célula huésped con el polipéptido Pkr Man3. En otros modos de realización, las composiciones que comprenden los polipéptidos Pkr Man3 pueden ser una adición de un polipéptido Pkr Man3 aislado, purificado de forma opcional, combinado físicamente con una o más celulasas y/u otras enzimas. Por ejemplo, la una o más celulasas pueden ser seleccionadas de ninguna o una o más beta-glucosidasas, una o más celobiohidrolasas, y/o una o más endoglucanasas. En determinados modos de realización específicos, dichas beta-glucosidasas, celobiohidrolasas y/o endoglucanasas, si se encuentran presentes, pueden ser coexpresadas con el polipéptido Pkr Man3 por una sola célula huésped. En algunos modos de realización, al menos dos de las dos o más celulasas pueden ser heterólogas entre sí o derivadas de distintos organismos. Por ejemplo, la composición puede comprender al menos una beta-glucosidasa y al menos una celobiohidrolasa, donde dicha beta-glucosidasa y dicha celobiohidrolasa no son del mismo microorganismo. En algunos modos de

realización, una o más de las celulasas son endógenas con respecto a la célula huésped, pero se sobreexpresan o expresan a un nivel que es diferente al que, de otra forma, se daría de forma natural en la célula huésped. Por ejemplo, una o más de las celulasas pueden ser un *Trichoderma reesei* CBH1 y/o CBH2, que son nativas de una célula huésped de *Trichoderma reesei*, pero alguna de CBH1 y CBH2, o ambas, se sobreexpresan o infraexpresan cuando se coexpresan en la célula huésped de *Trichoderma reesei* con un polipéptido Pkr Man3.

[0044] En determinados modos de realización, la composición que comprende el polipéptido Pkr Man3 recombinante puede comprender además una o más otras hemicelulasas, donde la una o más otras hemicelulasas son coexpresadas por una célula huésped con el polipéptido Pkr Man3. Por ejemplo, la una o más otras hemicelulasas pueden ser seleccionadas de una o más otras beta-mananasas, una o más xilanasas, una o más beta-xilosidasas, y/o una o más L-arabinofuranosidasas. En determinados modos de realización, dichas otras mananasas, xilanasas, beta-xilosidasas y L-arabinofuranosidasas, si se encuentran presentes, pueden ser coexpresadas con el polipéptido Pkr Man3 por una sola célula huésped; o, de forma alternativa, una o más o todas de dichas otras mananasas, xilanasas, beta-xilosidasas y L-arabinofuranosidasas, si se encuentran presentes, no se coexpresan con los polipéptidos Pkr Man3 en una sola célula huésped, sino que se mezclan o combinan físicamente para formar una composición de enzimas después de que las enzimas individuales sean producidas por sus respectivas células huésped.

[0045] En otros aspectos, la composición que comprende el polipéptido Pkr Man3 recombinante puede comprender además una o más celulasas y una o más otras hemicelulasas, donde la una o más celulasas y/o una o más otras hemicelulasas son coexpresadas por una célula huésped con el polipéptido Pkr Man3. Por ejemplo, un polipéptido Pkr Man3 puede coexpresarse con una o más beta-glucosidasas, una o más celobiohidrolasas, una o más endoglucanasas, una o más endo-xilanasas, una o más beta-xilosidasas, y/o una o más L-arabinofuranosidasas, además de otras enzimas o proteínas sin celulasas ni hemicelulasas en la misma célula huésped. De forma alternativa, la composición que comprende el polipéptido Pkr Man3 recombinante que comprende una o más celulasas y una o más otras hemicelulasas puede prepararse mezclando físicamente el polipéptido Pkr Man3 con una o más celulasas y una o más otras hemicelulasas postproducción, donde el polipéptido Pkr Man3 y la una o más celulasas y una o más otras hemicelulasas son producidas a partir de distintas células huésped. También se proporcionan composiciones que comprenden el polipéptido Pkr Man3 y las otras enzimas en el sobrenadante de un medio de cultivo o medios de cultivo, según proceda. Dicho sobrenadante del medio de cultivo puede utilizarse tal como está, con un procesamiento postproducción mínimo o nulo, lo que puede incluir típicamente filtración para eliminar restos celulares, procedimientos para matar células, y/o ultrafiltración u otras fases para enriquecer o concentrar las enzimas que se encuentran en el mismo. Dichos sobrenadantes se denominan "caldos enteros" o "caldos de celulasa enteros" en el presente documento.

[0046] En otros aspectos, la presente invención se refiere a un método de aplicación o utilización de la composición como se ha descrito anteriormente en condiciones adecuadas para degradar o convertir un material celulósico y para producir una sustancia a partir de un material celulósico.

[0047] En otro aspecto, se proporcionan métodos para degradar o convertir un material celulósico en azúcares fermentables, que comprenden: el contacto del material celulósico, que preferiblemente ha sido sometido a una o más fases de pretratamiento, con las composiciones de la invención para producir azúcares fermentables.

Breve descripción de los dibujos

[0048]

La **figura 1** representa un mapa del vector pZQ191 (aprE-PkrMan3).

La **figura 2** representa un mapa del constructo pTrex3gM.

La **figura 3** representa un perfil de pH de Pkr Man3. El efecto del pH en la actividad de beta-mananasa de Pkr Man3 se midió a 50 °C durante 10 minutos utilizando un 1 % de goma garrofín como sustrato en un tampón de 50 mM de citrato de sodio y 50 mM de fosfato de sodio ajustado en valores de pH individuales que varían entre pH 2-9. La actividad de mananasa del polipéptido Pkr Man3 en su pH óptimo se normalizó al 100 %, y la actividad de mananasa del mismo polipéptido en otros valores de pH se representó como una actividad relativa a la del pH óptimo.

La **figura 4** representa un perfil de temperatura de Pkr Man3. El efecto del cambio de temperatura en la actividad de beta-mananasa de Pkr Man3 se midió en valores de temperatura individuales que varían entre 40 °C y 84 °C durante 10 minutos utilizando un 1 % de goma garrofín como sustrato en un tampón de 50 mM de citrato de sodio, a pH 6.0. La actividad de mananasa del polipéptido Pkr Man3 a su temperatura óptima se

normalizó al 100 %, y la actividad de mananasa del mismo polipéptido a otros valores de temperatura se representó como una actividad relativa a la de la temperatura óptima.

La **figura 5** representa un perfil de termoestabilidad de Pkr Man3. La termoestabilidad de Pkr Man3 se determinó mediante incubación en un tampón de 50 mM de citrato de sodio a pH 6.0 a una temperatura establecida dentro del rango de 40 °C and 65 °C durante 2 horas. Tras la incubación, se midió la actividad de mananasa restante a cada temperatura de incubación. Se utilizó la actividad medida a partir de una muestra de control del polipéptido Pkr Man3 mantenida en hielo durante las mismas 2 horas como la actividad del 100 % para normalizar las medidas de actividad residual.

Las **figuras 6A-6C** representan la comparación de los niveles de hidrólisis conseguidos por una composición de celulasa/hemicelulasa comercial Accellerase® TRIO™ contra una mezcla de 9 partes de Accellerase® TRIO™ con 1 parte (esto es, 10 % en peso) de un polipéptido Pkr Man3, en comparación con la misma mezcla de Accellerase® TRIO™ con cada una de dos otras beta-mananasas de GH5, una beta-mananasa de *Bacillus hemicellulosilyticus* de SEQ ID NO:4 ("BamGh8") y una beta-mananasa de *Geobacillus tepidamans* de SEQ ID NO:5 ("Gte Man1"), de un sustrato de biomasa determinado, a saber, el sustrato de madera blanda pretratado con KRAFT alcalino FPP-27, en las mismas condiciones de hidrólisis y en distintas duraciones de reacción. La **figura 6A** representa los resultados de la hidrólisis tras 24 horas. La **figura 6B** representa los resultados de la hidrólisis tras 48 horas. La **figura 6C** representa los resultados de la hidrólisis tras 72 horas. Pueden encontrarse detalles de los experimentos en el ejemplo 9.

La **figura 7** representa la comparación de la hidrólisis total del sustrato de madera blanda pretratado con KRAFT alcalino FPP-27 por Accellerase® TRIO™ contra una mezcla de 9 partes de Accellerase® TRIO™ con 1 parte (p. ej., 10 % en peso) de un polipéptido Pkr Man3, una beta-mananasa de *Bacillus hemicellulosilyticus* de SEQ ID NO:4 ("BamGh8"), o una beta-mananasa de *Geobacillus tepidamans* de SEQ ID NO:5 ("Gte Man1"), después de un período de tiempo de 24 horas a 168 horas. Pueden encontrarse detalles de los experimentos en el ejemplo 9.

Las **figuras 8A-8F** representan las secuencias y los identificadores de secuencia de la presente exposición.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Sinopsis

[0049] En el presente documento se describen composiciones y métodos relacionados con una beta-mananasa recombinante perteneciente a la familia 5 de glucósido hidrolasa de *Paenibacillus kribbensis*. Las presentes composiciones y métodos se basan, en parte, en las observaciones de que los polipéptidos Pkr Man3 recombinantes confieren, a una composición de celulasa y/o hemicelulasa que comprende al menos una celulasa y/o al menos una otra hemicelulasa, una capacidad mejorada de hidrolizar una materia prima o un material de biomasa lignocelulósica en comparación con otras beta-mananasas conocidas con pH óptimos y temperaturas óptimas similares. Las presentes composiciones y métodos también se basan en la observación de que los polipéptidos Pkr Man3 recombinantes confieren una rápida reducción de la viscosidad cuando se utilizan composiciones que comprenden los polipéptidos para hidrolizar sustrato de biomasa lignocelulósica adecuados, especialmente cuando se tratan dichos sustratos a niveles de sólidos elevados, y cuando dichos sustratos contienen un nivel mensurable de galactoglucomanano (GGM) y/o glucomanano (GM). Estas características de los polipéptidos Pkr Man3 los hacen, así como a las variantes de los mismos, adecuados para su uso en numerosos procesos, incluyendo, por ejemplo, en la conversión o hidrólisis de una materia prima de biomasa lignocelulósica.

[0050] Antes de describir las presentes composiciones y métodos en mayor detalle, ha de entenderse que las presentes composiciones y métodos no se limitan a los modos de realización específicos descritos, dado que estos pueden variar, por supuesto. También ha de entenderse que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto la descripción de modos de realización específicos únicamente, y que no tiene carácter limitativo, dado que el alcance de las presentes composiciones y métodos solamente será limitado por las reivindicaciones anexas.

[0051] Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior y el inferior de dicho rango y cualquier otro valor declarado o intermedio en dicho rango declarado, está incluido en las presentes composiciones y métodos. Los límites superiores e inferiores de estos rangos más pequeños pueden incluirse de forma independiente en los rangos más pequeños y también están incluidos en las presentes composiciones y métodos, sin perjuicio de cualquier límite excluido específicamente en el rango declarado.

Cuando el rango declarado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen alguno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en las presentes composiciones y métodos.

5 **[0052]** Determinados rangos se presentan en el presente documento con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se utiliza en el presente documento para proporcionar apoyo literal al número exacto al que precede, así como a un número que es cercano o aproximado al número al que precede el término. Al determinar si un número es cercano o aproximado a un número recitado específicamente, el número no recitado cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número recitado específicamente. Por ejemplo, en conexión con un valor numérico, el término "aproximadamente" se refiere a un rango de -10 % a +10 % del valor numérico, a menos que el término se defina específicamente de otra forma en el contexto. En otro ejemplo, la frase un "valor de pH de aproximadamente 6" se refiere a valores de pH desde 5.4 a 6.6, a menos que el valor de pH se defina específicamente de otra forma.

15 **[0053]** Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los varios aspectos o modos de realización de las presentes composiciones y métodos que pueden tomarse como referencia a la memoria en su conjunto. Por consiguiente, los términos que se definen inmediatamente a continuación se definen de forma más completa con referencia a la memoria en su conjunto.

20 **[0054]** El presente documento se organiza en un número de secciones para facilitar la lectura; sin embargo, el lector apreciará que las afirmaciones realizadas en una sección pueden ser aplicables a otras secciones. De esta forma, los encabezamientos utilizados para las distintas secciones de la exposición no deberían interpretarse como limitativos.

25 **[0055]** A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenecen las presentes composiciones y métodos. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento también pueden utilizarse en la práctica o la prueba de las presentes composiciones y métodos, a continuación se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

30 **[0056]** La cita de cualquier publicación es para su divulgación anterior a la fecha de presentación y no debería interpretarse como una admisión de que las presentes composiciones y métodos no tienen derecho a preceder a dicha publicación por razón de invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que puede ser necesario confirmar de forma independiente.

35 **[0057]** De conformidad con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Nótese que las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. En consecuencia, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de dichas enzimas, y la referencia a "la dosis" incluye la referencia a una o más dosis y a equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, etc.

[0058] Nótese además que las reivindicaciones pueden estar redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Así, el propósito de esta afirmación es servir como antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva como "solamente", "únicamente" y similares en relación con la recitación de elementos reivindicados, o el uso de una limitación "negativa".

40 **[0059]** El término "recombinante", cuando se utiliza en referencia a una célula, un ácido nucleico, polipéptidos/enzimas o un vector objeto, indica que este ha sido modificado de su estado nativo. En consecuencia, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos a distintos niveles o en distintas condiciones de las que se hallan en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes pueden diferir de una secuencia nativa en uno o varios nucleótidos, y/o están ligados de forma operativa a secuencias heterólogas, p. ej., un promotor heterólogo, secuencias señal que permiten la secreción, etc., en un vector de expresión. Los polipéptidos/enzimas recombinantes pueden diferir de una secuencia nativa en uno o más aminoácidos y/o están fusionados con secuencias heterólogas. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una beta-mananasa es, por ejemplo, un vector recombinante.

50 **[0060]** Nótese además que el término "que consiste(n) esencialmente en", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición donde el/los componente(s) que se encuentra(n) tras el término está(n) en presencia de otro(s) componente(s) conocido(s) en una cantidad total que es inferior al 30 % en peso de la composición total y no contribuye(n) a las acciones o actividades del/de los componente(s), ni interfiere(n) con el/los mismo(s).

[0061] Nótese además que el término "que comprende(n)", tal como se utiliza aquí, significa que incluye, sin carácter limitativo, el/los componente(s) que se encuentra(n) tras el término "que comprende(n)". El/los componente(s) que se encuentra(n) tras el término "que comprende(n)" es/son necesario(s) u obligatorio(s), pero la composición que comprende el/los componente(s) puede comprender además otro(s) componente(s) no obligatorio(s) u opcional(es).

[0062] Nótese también que el término "que consiste(n) en", tal como se utiliza aquí, significa que incluye, con carácter limitativo, el/los componente(s) que se encuentra(n) tras el término "que consiste(n) en". El/los componente(s) que se encuentra(n) tras el término "que consiste(n) en" es/son, por lo tanto, necesario(s) u obligatorio(s), y ningún(os) otro(s) componente(s) está(n) presente(s) en la composición.

[0063] Como entenderán los expertos en la materia tras la lectura de la presente exposición, cada modo de realización individual descrito e ilustrado en el presente documento tiene componentes y características discretos que pueden separarse fácilmente de las características de cualquiera de los otros varios modos de realización, o combinarse con las mismas, sin apartarse del alcance o el espíritu de las presentes composiciones y métodos descritos en el presente documento. Cualquier método expuesto puede llevarse a cabo en el orden de eventos expuesto o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

2. Definiciones

[0064] "Beta-mananasa" significa un polipéptido o dominio polipeptídico de una enzima que tiene la capacidad de catalizar la escisión o la hidrólisis de enlaces (1→4)-beta-D-manosídicos de mananos, galactomananos y glucomananos.

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, "Pkr Man3" o "un polipéptido Pkr Man3" se refiere a una beta-mananasa perteneciente a la familia 5 de glucósido hidrolasa (p. ej., una beta-mananasa recombinante) derivada de *Paenibacillus kribbensis* (y sus variantes), que confiere mejoras sorprendentes a una composición de celulasa y/o hemicelulasa en lo que respecta a la capacidad de la composición de hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica, pretratado de forma opcional, en comparación con otras beta-mananasas conocidas con pH óptimos y/o temperaturas óptimas similares. El polipéptido Pkr Man3 puede sustituir una parte sustancial, p. ej., hasta aproximadamente un 20 % en peso (p. ej., hasta aproximadamente un 20 % en peso, hasta aproximadamente un 15 % en peso, hasta aproximadamente un 10 % en peso, hasta aproximadamente un 9 % en peso, hasta aproximadamente un 8 % en peso, hasta aproximadamente un 7 % en peso, hasta aproximadamente un 6 % en peso, hasta aproximadamente un 5 % en peso, hasta aproximadamente un 4 % en peso, hasta aproximadamente un 3 % en peso, hasta aproximadamente un 2 % en peso, hasta aproximadamente un 1 % en peso) de una mezcla de celulasa y/o hemicelulasa y obtener una igual o mejor hidrólisis de un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado en las mismas condiciones. Esto permite el uso de menos celulasas/hemicelulasas y una hidrólisis de biomasa más eficiente, lo que hace el proceso global de conversión de biomasa celulósica más factible y sostenible en términos económicos. También se descubrió que el polipéptido Pkr Man3 en el presente documento confiere una rápida reducción de la viscosidad o licuefacción, de forma especialmente prominente cuando el sustrato de biomasa es tratado con enzima a niveles de sólidos elevados. Según aspectos de las presentes composiciones y métodos, los polipéptidos Pkr Man3 incluyen aquellos que tienen la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2, así como los derivados o las variantes de polipéptido que tienen al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o con la secuencia madura de SEQ ID NO:2, o con un fragmento de al menos 80 residuos de extensión de SEQ. ID NO:2, donde los polipéptidos Pkr Man3 no solo tienen actividad de beta-mananasa y son capaces de catalizar la hidrólisis de conversión de enlaces (1→4)-beta-D-manosídicos de mananos, galactomananos y glucomananos, sino que también tienen una actividad de beta-mananasa más elevada que otras beta-mananasas con pH óptimos y/o temperaturas óptimas similares, y confieren una rápida reducción de la viscosidad y licuefacción de sustratos de biomasa de alto contenido en sólidos, una propiedad que no se ha observado con otras beta-mananasas conocidas.

[0066] "Familia 5 de glucósido hidrolasa" o "GH5" se refiere a los polipéptidos que entran dentro de la definición de familia 5 de glucósido hidrolasa según la clasificación de Henrissat, *Biochem. J.* 280:309-316 (1991), y de Henrissat & Cairoch, *Biochem. J.*, 316:695-696 (1996). De forma similar, "Familia 26 de glucósido hidrolasa" o "GH26" se refiere a los polipéptidos que entran dentro de la definición de familia 26 de glucósido hidrolasa según la clasificación de Henrissat, *Biochem. J.* 280:309-316 (1991), y de Henrissat & Cairoch, *Biochem. J.*, 316:695-696 (1996).

[0067] Los polipéptidos Pkr Man3 según las presentes composiciones y métodos descritas en el presente documento pueden ser aislados o purificados. Por purificación o aislamiento se entiende que el polipéptido Pkr

Man3 se altera con respecto a su estado natural por razón de la separación del Pkr Man3 de algunos o todos los constituyentes presentes de forma natural con los que se asocia naturalmente. Dicho aislamiento o purificación puede conseguirse mediante técnicas de separación reconocidas por los expertos en la materia, como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, separación hidrofóbica, diálisis, tratamiento con proteasa, precipitación con sulfato amónico u otra precipitación de proteínas por sales, centrifugación, cromatografía de exclusión por tamaños, filtración, microfiltración, electroforesis en gel o separación en un gradiente para eliminar células enteras, restos celulares, impurezas, proteínas extrañas, o enzimas no deseadas en la composición final. También es posible añadir entonces constituyentes a la composición que contiene Pkr Man3 que proporcionen beneficios adicionales, por ejemplo, agentes activadores, agentes antinhibidores, iones deseables, compuestos para controlar el pH u otras enzimas o productos químicos.

[0068] Tal como se utiliza en el presente documento, "microorganismo" se refiere a una bacteria, un hongo, un virus, un protozoo, y otros microbios u organismos microscópicos.

[0069] Tal como se utiliza aquí, un "derivado" o una "variante" de un polipéptido significa un polipéptido que se deriva de un polipéptido precursor (p. ej., el polipéptido nativo) por adición de uno o más aminoácidos a alguno del extremo C-terminal o el extremo N-terminal, o a ambos; por sustitución de uno o más aminoácidos en uno o en un número de sitios distintos en la secuencia de aminoácidos, por delección de uno o más aminoácidos en alguno de los extremos del polipéptido, o en ambos, o en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos, o por inserción de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos. La preparación de un derivado o una variante de Pkr Man3 puede obtenerse de cualquier forma conveniente, p. ej., mediante la modificación de una secuencia de ADN que codifica los polipéptidos nativos, la transformación de dicha secuencia de ADN en un huésped adecuado, y la expresión de la secuencia de ADN modificada para formar el derivado/variante de Pkr Man3. Los derivados o variantes incluyen además los polipéptidos Pkr Man3 que están modificados químicamente, p. ej., glicosilación u otro cambio de una característica del polipéptido Pkr Man3 realizado de una forma distinta. Mientras los derivados y variantes de Pkr Man3 estén abarcados por las presentes composiciones y métodos, dichos derivados y variantes presentarán una actividad de beta-mananasa mejorada en las mismas condiciones de hidrólisis del sustrato de biomasa lignocelulósica, en comparación con la de un número de otras beta-mananasas que tengan pH óptimos y temperaturas óptimas similares, por ejemplo el BamGh8, que tiene una la secuencia de SEQ ID NO:4, o el Gte Man1, que tiene la secuencia de SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización dichos derivados y variantes también conferirán una rápida reducción de la viscosidad y licuefacción a una composición de celulasa y/o hemicelulasa, capaz de conseguir, por ejemplo, al menos un 10 % (p. ej., al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, o incluso más) de reducción de la viscosidad mejorada o licuefacción más elevada en el mismo período de tiempo después de que el sustrato de biomasa se someta a una composición de enzimas que comprenda un polipéptido Pkr Man3 como el aquí descrito, en comparación con cuando el mismo sustrato de biomasa se somete a una composición de enzimas homóloga que tenga las mismas cantidades, proporciones, y tipos de enzimas, salvo que la composición no comprende el polipéptido Pkr Man3.

[0070] En determinados aspectos, un polipéptido Pkr Man3 de las composiciones y métodos aquí descritos también puede abarcar un fragmento funcional de un polipéptido o un fragmento de polipéptido que tenga actividad de beta-mananasa, que se derive de un polipéptido original, que puede ser el polipéptido de extensión completa que comprenda o consista en SEQ ID NO:2, o la secuencia madura que comprenda o consista en SEQ ID NO:3. El polipéptido funcional puede haber sido truncado, bien en la región N-terminal, bien en la región C-terminal, o en ambas regiones para generar un fragmento del polipéptido original. A efectos de la presente exposición, un fragmento funcional debe tener al menos un 20 %, más preferiblemente al menos un 30 %, un 40 %, un 50 %, o preferiblemente, al menos un 60 %, un 70 %, un 80 %, o incluso más preferiblemente al menos un 90 % de la actividad de beta-mananasa del polipéptido original.

[0071] En determinados aspectos, un derivado/variante de Pkr Man3 tendrá cualquier valor entre un 55 % y un 99 % (o más) de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO:2, o con la secuencia madura SEQ ID NO:3, p. ej., un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ. ID NO:2 o con la secuencia madura SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, las sustituciones de aminoácidos son "sustituciones conservativas de aminoácidos" que utilizan L-aminoácidos, donde un aminoácido se reemplaza por otro aminoácido biológicamente similar. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son aquellas que preservan la carga general, la hidrofobicidad/hidrofilicidad, y/o el volumen estérico del aminoácido que se sustituye. Ejemplos de sustituciones conservativas son los que se encuentran entre los siguientes grupos: Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Lys/Arg, Asn/Gln, Glu/Asp, Ser/Cys/Thr, y Phe/Trp/Tyr. Un derivado puede, por ejemplo, diferir tan solo de 1 a 10 residuos de aminoácidos, como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácidos. En algunos modos de realización, un derivado de Pkr man3 puede tener una delección de

N-terminal y/o C-terminal, donde el derivado de Pkr Man3, excluyendo la(s) parte(s) terminal(es) delecionada(s), es idéntico a una subregión contigua en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3.

[0072] Tal como se utiliza aquí, "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a las secuencias de aminoácidos o nucleótidos identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticas a los residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia de Pkr Man3, tras alinear las secuencias e introducir huecos (*gaps*), en caso de ser necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia.

[0073] Por "homólogo", se entenderá una entidad que tenga un grado especificado de identidad con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencia de nucleótidos objeto. Una secuencia homóloga ha de incluir una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o incluso un 99 % idéntica a la secuencia objeto, utilizando herramientas de alineamiento de secuencias convencionales (p. ej., Clustal, BLAST, y similares). Típicamente, los homólogos incluirán los mismos residuos de sitio activo que la secuencia de aminoácidos objeto, a menos que se especifique otra cosa.

[0074] Los expertos en la materia conocen métodos para realizar el alineamiento de secuencias y determinar la identidad de secuencia, estos pueden realizarse sin experimentación indebida, y los cálculos de valores de identidad pueden obtenerse con precisión. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulo 19 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York); y el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.). Se dispone de un número de algoritmos para alinear secuencias y determinar la identidad de secuencia y estos incluyen, por ejemplo, el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; el algoritmo de alineamiento local de Smith *et al.* (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; la búsqueda de un método de similitud de Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444; el algoritmo de Smith-Waterman (*Meth. Mol. Biol.* 70:173-187 (1997); y los algoritmos de BLASTP, BLASTN, y BLASTX (véase Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410).

[0075] También se dispone de programas informáticos que utilizan estos algoritmos, entre los que se encuentran, sin carácter limitativo: el software ALIGN o Megalign (DNASTAR), o WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, (1996) *Meth. Enzym.*, 266:460-480); o GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA, disponibles en el paquete de Genetics Computing Group (GCG), versión 8, Madison, Wisconsin, EE. UU.; y CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California. Los expertos en la materia pueden determinar parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para conseguir un alineamiento máximo a lo largo de las secuencias que se comparan. Preferiblemente, la identidad de secuencia se determina utilizando los parámetros por defecto determinados por el programa. De forma específica, la identidad de secuencia puede determinarse utilizando Clustal W (Thompson J.D. *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680) con los parámetros por defecto, esto es:

	Gap opening penalty [penalización por apertura de hueco]:	10.0
	Gap extension penalty [penalización por extensión de hueco]:	0.05
40	Protein weight matrix [matriz de peso de proteína]:	BLOSUM series
	DNA weight matrix [matriz de peso de ADN]:	IUB
	Delay divergent sequences % [% de retraso de secuencias divergentes]:	40
	Gap separation distance [distancia de separación de hueco]:	8
	DNA transitions weight [peso de transiciones de ADN]:	0.50
45	List hydrophilic residues [listar residuos hidrofílicos]:	GPSNDQEKR
	Use negative matrix [usar matriz negativa]:	OFF
	Toggle Residue specific penalties [alternar penalizaciones específicas por residuos]:	ON

Toggle hydrophilic penalties [alternar penalizaciones hidrofílicas]: ON

Toggle end gap separation penalty [alternar penalización por separación de extremo de hueco] OFF

[0076] Tal como se utiliza aquí, "vector de expresión" significa un constructo de ADN que incluye una secuencia de ADN que está ligada de forma operativa a una secuencia de control adecuada capaz de afectar a la expresión del ADN en un huésped adecuado. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para afectar a la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifique sitios de unión del ribosoma en el ARNm, y secuencias que controlen la terminación de la transcripción y la traducción. Los distintos tipos de células pueden utilizarse con distintos vectores de expresión. Un ejemplo de promotor para vectores utilizado en *Bacillus subtilis* es el promotor AprE; un ejemplo de promotor utilizado en *Streptomyces lividans* es el promotor A4 (de *Aspergillus niger*); un ejemplo de promotor utilizado en *E. coli* es el promotor Lac; un ejemplo de promotor utilizado en *Saccharomyces cerevisiae* es *PGK1*; un ejemplo de promotor utilizado en *Aspergillus niger* es *glaA*; y un ejemplo de promotor para *Trichoderma reesei* es *cbhl*. El vector puede ser un plásmido, una partícula fágica, o simplemente un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector puede replicarse y funcionar con independencia del genoma huésped, o puede, en condiciones adecuadas, integrarse en el propio genoma. En la presente memoria, en ocasiones se utilizan plásmido y vector indistintamente. No obstante, las presentes composiciones y métodos están destinados a incluir otras formas de vectores de expresión que desempeñen funciones equivalentes y que se conozcan, o se den a conocer, en este ámbito de especialización. En consecuencia, puede emplearse una amplia variedad de combinaciones vector de expresión/huésped al expresar las secuencias de ADN descritas en el presente documento. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, como varios derivados conocidos de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., los plásmidos de *E. coli* incluyendo col E1, pCR1, pBR322, pMb9, pUC 19 y sus derivados, plásmidos de rangos de huéspedes más amplios, p. ej., RP4, ADN fágicos, p. ej., los numerosos derivados de fago λ , p. ej., NM989, y otros fagos de ADN, p. ej., M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario, plásmidos de levadura como el plásmido 2μ o derivados del mismo, vectores útiles en células eucariotas, como vectores útiles en células animales y vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fágicos, como plásmidos que han sido modificados para emplear ADN fágico u otras secuencias de control de expresión. En este ámbito de especialización se conocen técnicas de expresión que utilizan los vectores de expresión de las presentes composiciones y métodos, y estas se describen de forma general en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Press (1989). Con frecuencia, dichos vectores de expresión que incluyen las secuencias de ADN aquí descritas se transforman en un huésped unicelular por inserción directa en el genoma de una especie concreta a través de un evento de integración (véase, p. ej., Bennett & Lasure, *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, San Diego, pp. 70-76 (1991) y los artículos citados en este que describen la inserción genómica dirigida en huéspedes fúngicos).

[0077] Tal como se utiliza en el presente documento, "cepa huésped" o "célula huésped" significa un huésped adecuado para un vector de expresión que incluye ADN según las presentes composiciones y métodos. Las células huésped útiles en las presentes composiciones y métodos son, por lo general, huéspedes procariotas o eucariotas, en los que se incluye cualquier microorganismo transformable en el que pueda conseguirse expresión. Concretamente, las cepas huésped pueden ser *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces lividans*, *Escherichia coli*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chryso sporium lucknowence*, *Myceliophthora thermophila*, y varias otras células microbianas. Las células huésped se transforman o transfectan con vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinantes. Dichas células huésped transformadas pueden ser capaces de replicar los vectores que codifican Pkr Man3 (y sus derivados o variantes (mutantes)) y/o de expresar el producto péptido deseado. En determinados modos de realización según las presentes composiciones y métodos, "célula huésped" significa tanto las células como los protoplastos creados a partir de las células de *Trichoderma sp.*

[0078] Los términos "transformado/a(s)", "transformado/a(s) de forma estable" y "transgénico/a(s)", utilizados en referencia a una célula significan que la célula contiene una secuencia de ácido nucleico no nativa (p. ej., heteróloga) integrada en su genoma o portada como un episoma que se mantiene a través de múltiples generaciones.

[0079] El término "introducido/a(s)" en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula significa "transfección", o "transducción", como se conoce en este ámbito de especialización.

[0080] Una "cepa huésped" o "célula huésped" es un organismo en el que se ha introducido un vector de expresión, fago, virus, u otro constructo de ADN, entre lo que se incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una beta-mananasa). Ejemplos de cepas huésped son las células microbianas (p. ej., bacterias, hongos filamentosos, y levadura) capaces de expresar el polipéptido de interés. El término "célula huésped" incluye los protoplastos creados a partir de células.

[0081] El término "heterólogo/a(s)", en referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no está presente de forma natural en una célula huésped.

[0082] El término "endógeno/a(s)", en referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que está presente de forma natural en la célula huésped.

5 **[0083]** El término "expresión" se refiere al proceso mediante el que se produce un polipéptido sobre la base de una secuencia de ácido nucleico. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

10 **[0084]** Tal como se utiliza en el presente documento, "secuencia señal" significa una secuencia de aminoácidos ligada a la parte N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína fuera de la célula. Esta definición de una secuencia señal es funcional. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia señal que se escinde durante el proceso de secreción. Si bien la secuencia señal nativa de Pkr Man3 puede emplearse en aspectos de las presentes composiciones y métodos, pueden emplearse otras secuencias señal no nativas (p. ej., una seleccionada de SEQ ID NOs:8-36).

15 **[0085]** Se puede hacer referencia a los polipéptidos de beta-mananasa de la invención como "precursor(es)", "inmaduro(s)", o "de longitud completa", en cuyo caso incluyen una secuencia señal, o se puede hacer referencia a los mismos como "maduro(s)", en cuyo caso carecen de una secuencia señal. Por lo general, las formas maduras de los polipéptidos son las más útiles. A menos que se indique lo contrario, la numeración de residuos de aminoácidos empleada en el presente documento se refiere a las formas maduras de los respectivos polipéptidos de beta-mananasa. Los polipéptidos de beta-mananasa de la invención también pueden truncarse para eliminar los N o C-terminales, siempre que los polipéptidos resultantes retengan actividad de beta-mananasa.

20 **[0086]** Los polipéptidos de beta-mananasa de la invención también pueden ser un polipéptido "quimérico" o "híbrido", dado que incluye al menos una parte de un primer polipéptido de beta-mananasa, y al menos una parte de un segundo polipéptido de beta-mananasa (dichos polipéptidos de beta-mananasa quiméricos pueden, por ejemplo, derivarse de la primera y la segunda beta-mananasa utilizando tecnologías conocidas que conllevan el intercambio de dominios en cada beta-mananasa). Los presentes polipéptidos de beta-mananasa pueden comprender además secuencias señal heterólogas, un epítipo para permitir el seguimiento o la purificación, o similares. Cuando se utiliza el término "heteróloga" para hacer referencia a una secuencia señal utilizada para expresar un polipéptido de interés, se quiere decir que la secuencia señal se deriva, por ejemplo, de un microorganismo distinto como el polipéptido de interés. Algunos ejemplos de secuencias señal heterólogas adecuadas para expresar los polipéptidos Pkr Man3 en el presente documento pueden ser, por ejemplo, las de *Trichoderma reesei*, otra *Trichoderma spp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, otra *Aspergillus spp.*, *Chrysosporium*, y otros organismos, las de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, otras especies de *Bacillus*, *E.coli.*, u otros microbios adecuados.

25 **[0087]** Tal como se utilizan en el presente documento, "unido/a de forma funcional" o "ligado/a de forma operativa" significa que una región reguladora o un dominio funcional que tiene una actividad conocida o deseada, como un promotor, un terminador, una secuencia señal o una región potenciadora se encuentra unido o ligado a una diana (p. ej., un gen o polipéptido) de tal forma que permite a la región reguladora o al dominio funcional controlar la expresión, la secreción o la función de dicha diana según su actividad conocida o deseada.

30 **[0088]** Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "polipéptido" y "enzima" se utilizan indistintamente para hacer referencia a polímeros de cualquier longitud que comprenden residuos de aminoácidos ligados por enlaces peptídicos. En el presente documento se emplean los códigos de dos o tres letras convencionales para residuos de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención, por ejemplo, formación de puentes disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, como conjugación con un componente marcador. En la definición también se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (entre los que se incluyen, por ejemplo, los aminoácidos no naturales, etc.) así como otras modificaciones conocidas en el ámbito de especialización.

35 **[0089]** Tal como se utiliza en el presente documento, los genes, las enzimas o las cepas "natural(es)" y "nativo/a(s)" son los que se hallan en la naturaleza.

[0090] Los términos "natural", "original," o "de referencia", con respecto a un polipéptido, se refieren a un polipéptido de origen natural que no incluye una sustitución, inserción o delección artificial en una o más posiciones de aminoácidos. De forma similar, los términos "natural", "original," o "de referencia", con respecto a

un polinucleótido, se refieren a un polinucleótido de origen natural que no incluye un cambio de nucleósidos artificial. No obstante, un polinucleótido que codifica un polipéptido natural, original o de referencia no se limita a un polinucleótido de origen natural, sino que abarca cualquier polinucleótido que codifica el polipéptido natural, original o de referencia.

- 5 **[0091]** Tal como se utiliza en el presente documento, una "variante de polipéptido" se refiere a un polipéptido derivado de un polipéptido original (o de referencia) mediante la sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos, típicamente mediante técnicas de ADN recombinante. Las variantes de polipéptido pueden diferir de un polipéptido original en un pequeño número de residuos de aminoácidos. Pueden definirse por su nivel de homología/identidad de secuencia primaria de aminoácidos con un polipéptido original. De forma adecuada, las
- 10 variantes de polipéptido tienen al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o incluso al menos un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido original.
- 15 **[0092]** Tal como se utiliza en el presente documento, una "variante de polinucleótido" codifica una variante de polipéptido, tiene un grado específico de homología/identidad con un polinucleótido original, o se hibrida en condiciones astringentes con un polipéptido original o el complemento del mismo. De forma adecuada, una variante de polinucleótido tiene al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o incluso al menos un 99 % o incluso al menos un 99 % de identidad de secuencia de nucleótidos con un polinucleótido original o con un complemento del polinucleótido original. En este ámbito de especialización, se conocen métodos para determinar el porcentaje de identidad, y estos se han descrito con anterioridad.
- 20
- 25 **[0093]** Los términos "derivado/a(s) de" y "se deriva(n) de" abarcan los términos "originado/a(s) de", "obtenido/a(s) de", "obtenible(s) de" "aislado/a(s) de" y "creado/a(s) a partir de" e indican de forma general que un material específico tiene su origen en otro material específico o tiene características que pueden describirse con referencia al otro material específico.
- 30 **[0094]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "condiciones de hibridación" se refiere a las condiciones en las que se llevan a cabo las reacciones de hibridación. Normalmente, estas condiciones se clasifican por el grado de "astringencia" de las condiciones en las cuales se mide la hibridación. El grado de astringencia puede basarse, por ejemplo, en la temperatura de fusión (T_m) de la sonda o el complejo de unión a ácidos nucleicos. Por ejemplo, la "astringencia máxima" ocurre normalmente aproximadamente a $T_m - 5$ °C (5 °C por debajo de la T_m de la sonda); la "astringencia elevada", aproximadamente a 5-10 °C por debajo de la T_m ; la "astringencia intermedia", aproximadamente a 10-20 °C por debajo de la T_m de la sonda; y la "astringencia baja", aproximadamente a 20-25 °C por debajo de la T_m . De forma alternativa o adicional, las condiciones de hibridación pueden basarse en las condiciones de hibridación relacionadas con fuerza iónica o sal, y/o en uno o más lavados de astringencia, p. ej.: 6X SSC = astringencia muy baja; 3X SSC = astringencia de baja a media; 1X SSC = astringencia media; y 0,5X SSC = astringencia elevada. Funcionalmente, las condiciones de astringencia máxima pueden utilizarse para identificar secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad exacta o casi exacta con la sonda de hibridación; mientras que las condiciones de astringencia elevadas se utilizan para identificar secuencias de ácido nucleico que tienen aproximadamente un 80 % o más de identidad de secuencia con la sonda. Para aplicaciones que requieren una selectividad elevada, normalmente es deseable utilizar condiciones relativamente astringentes para formar los híbridos (p. ej., se utilizan condiciones de sal relativamente bajas y/o condiciones de temperatura relativamente elevadas).
- 35
- 40
- 45 **[0095]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hibridación" se refiere al proceso mediante el que una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de apareamiento de bases, como se conoce en el ámbito de especialización. De forma más específica, "hibridación" se refiere al proceso mediante el que una cadena de ácido nucleico forma un dúplex, es decir, empareja sus bases con una cadena complementaria, como sucede durante las técnicas de hibridación por transferencia (*blot*) y las técnicas de PCR. Se considera que una secuencia de ácido nucleico "puede hibridarse de forma selectiva" con una secuencia de ácido nucleico de referencia si las dos secuencias de forma específica se hibridan mutuamente en condiciones de lavado e hibridación de astringencia moderada a elevada. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m) de la sonda o el complejo de unión a ácidos nucleicos. Por ejemplo, la "astringencia máxima" ocurre normalmente aproximadamente a $T_m - 5$ °C (5 °C por debajo de la T_m de la sonda); la "astringencia elevada", aproximadamente a 5-10 °C por debajo de la T_m ; la "astringencia intermedia", aproximadamente a 10-20 °C por debajo de la T_m de la sonda; y la "astringencia baja", aproximadamente a 20-25 °C por debajo de la T_m . Funcionalmente, las condiciones de astringencia máxima pueden utilizarse para identificar secuencias que tienen una identidad exacta o casi exacta con la sonda de hibridación; mientras que
- 50
- 55

las condiciones de astringencia intermedias o bajas se pueden utilizar para detectar homólogos de secuencias de polinucleótidos.

[0096] En este ámbito de especialización, se conocen bien las condiciones de hibridación intermedias y elevadas. Por ejemplo, las hibridaciones de astringencia intermedia pueden realizarse con una incubación durante toda la noche a 37 °C en una solución que comprenda formamida al 20 %, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato de trisodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.6), 5 x solución Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en 1x SSC a aproximadamente 37 - 50 °C. Las condiciones de hibridación de astringencia elevada pueden ser hibridación a 65° C y 0,1X SSC (donde 1X SSC = 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato Na₃, pH 7.0). De forma alternativa, las condiciones de hibridación de astringencia elevada pueden realizarse aproximadamente a 42 °C en formamida al 50 %, 5X SSC, 5X solución Denhardt, SDS al 0,5 % y 100 µg/ml ADN portador desnaturalizado seguido de lavar dos veces 2X SSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente y dos veces adicionales en 0,1X SSC y SDS al 0,5 % a 42 °C. Y las condiciones de hibridación de astringencia muy elevado pueden ser hibridación a 68 °C y 0,1X SSC. Los expertos en la materia saben cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. como sea necesario para adaptarse a factores como la longitud de la sonda, y similares.

[0097] Un ácido nucleico que codifique una variante de beta-mananasa puede tener una T_m reducida en 1 °C – 3 °C o más en comparación con un dúplex formado entre el nucleótido de SEQ ID NO:1 y su complemento idéntico.

[0098] La frase "sustancialmente similar(es)" o "sustancialmente idéntico(s)", en el contexto de al menos dos ácidos nucleicos o polipéptidos, significa que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o incluso al menos aproximadamente un 99 % idéntica a una secuencia original o de referencia, o no incluye sustituciones, inserciones, deleciones o modificaciones de aminoácidos realizadas para eludir la presente descripción sin añadir funcionalidad.

[0099] Tal como se utiliza en el presente documento, un "vector de expresión" se refiere a un constructo de ADN que contiene una secuencia de ADN que codifica un polipéptido específico y está ligada de forma operativa a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión de los polipéptidos en un huésped adecuado. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifique sitios de unión del ribosoma en el ARNm y/o secuencias que controlen la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula fágica, o un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector puede replicarse y funcionar con independencia del genoma huésped, o puede, en algunos casos, integrarse en el genoma huésped.

[0100] El término "recombinante" se refiere al material genético (esto es, ácidos nucleicos, los polipéptidos codificados por estos, y los vectores y las células que comprenden dichos polinucleótidos) que ha sido modificado para alterar sus características de secuencia o expresión, como por ejemplo mutando la secuencia codificadora para producir un polipéptido alterado, fusionando la secuencia codificadora con la de otro gen, poniendo un gen bajo el control de un promotor distinto, expresando un gen en un organismo heterólogo, expresando un gen en niveles reducidos o elevados, expresando un gen de forma condicional o constitutiva de una manera distinta a la de su perfil de expresión natural, y similares. Por lo general, los polipéptidos y los ácidos nucleicos recombinantes, así como las células basadas en los mismos, han sido manipulados por una persona de forma que no son idénticos a los ácidos nucleicos, los polipéptidos y las células relacionados que se hallan en la naturaleza.

[0101] Una "secuencia señal" se refiere a una secuencia de aminoácidos ligada a la parte N-terminal de un polipéptido, y que facilita la secreción de la forma madura del polipéptido a partir de la célula. La forma madura del polipéptido extracelular carece de la secuencia señal que se escinde durante el proceso de secreción.

[0102] El término "marcador selectivo" o "marcador de selección" se refiere a un gen capaz de expresarse en una célula huésped que permite facilitar la selección de aquellos huéspedes que contienen un ácido nucleico o vector introducidos. Entre los ejemplos de marcadores de selección se incluyen, sin carácter limitativo, sustancias antimicrobianas (p. ej., higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, como una ventaja nutricional, en la célula huésped.

[0103] El término "elemento regulador" se refiere a un elemento genético que controla algún aspecto de la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor es un elemento regulador que facilita la iniciación de la transcripción de una región codificadora ligada de forma operativa. Ente los elementos

reguladores adicionales, se incluyen señales de corte y empalme, señales de poliadenilación y señales de terminación.

5 **[0104]** Tal como se utiliza en el presente documento, las "células huésped" son por lo general células de huéspedes procariotas o eucariotas que se transforman o transfectan con vectores construidos utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas en el ámbito de especialización. Las células huésped transformadas son capaces, bien de replicar vectores que codifiquen las variantes de polipéptido, bien de expresar la variante de polipéptido deseada. En el caso de los vectores, que codifican la pre o proforma de la variante de polipéptido, dichas variantes, cuando se expresan, normalmente son secretadas desde la célula huésped hacia el medio de la célula huésped.

10 **[0105]** El término "introducido/a(s)", en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, significa transformación, transducción o transfección. Entre los medios de transformación, se incluyen transformación de protoplastos, precipitación de cloruro cálcico, electroporación, ADN desnudo, y similares, tal como se los conoce en el ámbito de especialización. (Véase, Chang and Cohen (1979) Mol. Gen. Genet. 168:111-115; Smith *et al.*, (1986) Appl. Env. Microbiol. 51:634; y el compendio bibliográfico de Ferrari *et al.*, en Harwood, Bacillus, Plenum Publishing Corporation, pp. 57-72, 1989).

[0106] Las secuencias polipeptídicas "fusionadas" están conectadas, esto es, ligadas de forma operativa, por medio de un enlace peptídico entre dos secuencias de polipéptidos objeto.

[0107] El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina, especialmente la especie Pezizomycotina.

20 **[0108]** Otros términos técnicos y científicos tendrán el mismo significado que el conocido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente exposición (véase, p. ej., Singleton y Sainsbury, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2a Ed., John Wiley and Sons, NY 1994; y Hale y Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY 1991).

25 **[0109]** La enzima beta-mananasa de *Paenibacillus kribbensis* (SEQ ID NO:2) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MRDWRLYGKKAFFIIFLLCSSVGLLNAGTSFAASGFYVSGNNLKDANGNNFVMRGVNN
 PHIWFDAQAYQALDAIAATKSNTVRIVWQTNGSAQRLGEIIERAKQLKLISVVELHDVT
 GSNDANRLNDMARYFADPAVKKILADNQKYVLVNIANEWGDHNLSDAAWRDAYKTA
 ITTLRNAGVPNTIVIDGSGWGQYASPIKAHGVELLQHDPNHNILFSVHMYANYNDSSKI
 GSELQAIKDKGLAVIVGEFGYNYNNGNNNLGTTVNPYVMKQSQAKGIGYLAWSWTG
 NSENAWLDLVNSSDWKTPTAWGNTVFNDVNGIKNTSKKASVY

[0110] La enzima beta-mananasa madura, basada en la eliminación de la secuencia de péptido señal prevista de SEQ ID NO:3:

ASGFYVSGNNLKDANGNNFVMRGVNNPHIWFDAQAYQALDAIAATKSNTVRIVWQTN
 GSAQRLGEIIERAKQLKLISVVELHDVTGSNDANRLNDMARYFADPAVKKILADNQKY
 VLVNIANEWGDHNLSDAAWRDAYKTAITTLRNAGVPNTIVIDGSGWGQYASPIKAHG
 VELLQHDPNHNILFSVHMYANYNDSSKIGSELQAIKDKGLAVIVGEFGYNYNNGNNNLG
 TTVNPYVMKQSQAKGIGYLAWSWTGENSENAWLDLVNSSDWKTPTAWGNTVFNDV
 30 NGIKNTSKKASVY

[0111] En el presente documento, se ha utilizado como moléculas referentes un número de otras beta-mananasas bacterianas que tienen pH óptimos y/o temperaturas óptimas similares, entre las que se incluye una beta-mananasa de GH26, llamada en el presente documento "BamGh8", de la cepa FZB42 de *Bacillus amyloliquefaciens*, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4):

MLKKLAVCLSIIVLLLLGAASPISAHTVYVPVNPNAQQTTKDIMNWLHLNPNRSEN RVMS
 GAFGGYSVDVTFMTEENRLKNATGQSPAIIYGCYGRGWLETADITDSIDYSCNSSLISY
 WKSGGLPQVSLHLANPAFPSGNKYTAISNSQYKNILDPSTVEGKRLEALLSKIADGLTQL
 KNQGVTVLFRPLHEMNGEWFWWGLTGYNQKDNERISLYKELYKKIYRYMTETRGLD
 NLLWVYSPDANRDFKTDYFPGSSYVDITGLDAYFTDPYAISGYDEMLSLKKPFAFAETG
 PSGNIGSFDYAAFINAIRQKYPETTYFLTWDEQLSPAANLGAQALYQNSWTLNKGEIWN
 GGSLTPIAE

[0112] Las beta-mananases referentes también incluyen una beta-mananasa de GH26 de *Geobacillus tepidamans*, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:5):

MKIGKWL VFFMSSTIVLSTISAYAQTSVTSSVSLSTVSQAKKQKNPSKPNKRVENLVDPLAT
 DDTKSLFAYLKDVRGKQVLFQGHQHAIDEGTLIGSKELESEVKNVSGDFPAVFGWDTLS
 LEGKEKPGVPNDPKQSRANLVASMKKVHKLGGIIALSAHMPNFVTGGSFNDTTGNVVE
 HILPGGDKNAEFNSFLDNIAQFAKELKDDKQKQIPILFRPFHEQNGSWFWGAKTTTPS
 QYIEIYRYTVEYLRDKKGVHNFLYVYSPNGTFFGSEANYLTTPGDDYVDILGMDQYD
 NQSNPGTTQFLTNLVKDLEMISKLADTKGKIAAFSEFGYSPQGMKTTGNGDLKWFTKV
 LNAIKADRNAKRIAYMQTWANFGLNGNLFVPYNDAPNGLGDHELLPDFINYYKDPYT
 AFLREVKGVYNNKVEAAKEQPFMHASPTDNATVKTATTKIRVRVLNPKPSKVYVVE
 GSSKEVPMKLDADGYYSANWSPVSKFNGKSVKITVKSYPNKTVMKQTVNVFVKVPE
 ILIKQFTFDRDIKIRNIGTWPDTIKTNFEHARLNGNGKLKINITGMVRTDTWQEIKLELS
 NIKDIVPLSNVNRVKFDVLPVSAGQQANASLRGIIMLPPDWNEKYGMTTTEKALAN
 LQVTINRVKYAEFPVMIDLNDPAKLSAAKGLVLSIVGNGLLENGAVYVDNIKLFSTYT
 ETPTDPALVDDFESYQGSNAVLQKQFVKAGGDTITVSLDGSKSSGTYAMKVDYTLAG
 SGYAGVTKSLGGVDWSRFNKLKFWLTPDGKDQKLVIQLRVDGVYVEAYPSLASTTPG
 WVVELHFNDFTVAPWDTANLGKLNKISLKNVQDFAIYVNSKNGTTLSSSTLYFDDIKAIY
 DATAASVPNGGTGPGSTPEQPGLTYDFETGVQGWVEQNGANATTPTITTDAAAKGTH
 SLTSTFDLTKTGGFELTKVQVVDLSAVKTISAKVKISTGTANARLYIKTGSNWQWHDSG
 MVAVDSSEFKTLTISLNPAGIDNVKISGVKIEPTSGTGNASVYVDDVALS

5 **3. Polipéptidos, polinucleótidos, vectores y células huésped de beta-mananasa**

A. Polipéptidos Pkr Man3

[0113] Las presentes composiciones y métodos emplean un polipéptido de beta-mananasa Pkr Man3 recombinante, fragmentos del mismo, o variantes del mismo que tengan actividad de beta-mananasa. Un ejemplo de un polipéptido de beta-mananasa recombinante se aisló de *Paenibacillus kribbensis*. El polipéptido Pkr Man3 maduro tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:3. Pueden hallarse de forma natural polipéptidos Pkr Man3 similares o sustancialmente similares, p. ej., en otras cadenas o cepas aisladas de *Paenibacillus kribbensis*, o *Paenibacillus spp.* En las presentes composiciones y métodos, pueden utilizarse estos y otros polipéptidos Pkr Man3 recombinantes.

[0114] En algunos modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 recombinante es una variante de polipéptido Pkr Man3 que tiene un grado específico de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido Pkr Man3 ejemplificado, p. ej., al menos un 55 %, al menos un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, o incluso al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o con la secuencia madura

SEQ ID NO:3. La identidad de secuencia se puede determinar mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos, p. ej., utilizando un programa como BLAST, ALIGN o CLUSTAL, como se ha descrito en el presente documento.

5 **[0115]** En determinados modos de realización, los polipéptidos Pkr Man3 recombinantes son producidos de forma recombinante, en un microorganismo, por ejemplo, en organismo hospedador fúngico o bacteriano, mientras que en otros los polipéptidos Pkr Man3 son producidos de forma sintética, o son purificados a partir de una fuente natural (p. ej., *Paenibacillus kribbensis*).

10 **[0116]** En determinados modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 recombinante incluye sustituciones que no afectan de forma sustancial a la estructura y/o la función del polipéptido. Entre los ejemplos de estas sustituciones, se encuentran las mutaciones conservadoras, como se resume en la tabla I.

Tabla I. Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	Código	Sustituciones aceptables
Alanina	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, beta-Ala, Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Tip, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3,4, o 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, L-I-tiazolidina-4- ácido carboxílico, D-o L-1-oxazolidina-4-ácido carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0117] Las sustituciones que involucran aminoácidos de origen natural se realizan generalmente mutando un ácido nucleico que codifica un polipéptido Pkr Man3 recombinante, y expresando entonces la variante de polipéptido en un organismo. Las sustituciones que involucran aminoácidos de origen no natural o modificaciones

químicas a los aminoácidos se realizan generalmente modificando químicamente un polipéptido Pkr Man3 después de ser sintetizado por un organismo.

5 **[0118]** En algunos modos de realización, las variantes de polipéptido Pkr Man3 recombinante son sustancialmente idénticas a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, lo que significa que no incluyen sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos que no afecten de forma significativa a la estructura, la función o la expresión del polipéptido. Dichas variantes de polipéptido Pkr Man3 recombinante incluirán aquellas designadas para eludir la presente descripción. En algunos modos de realización, las variantes de polipéptido Pkr Man3 recombinante, las composiciones y los métodos que comprenden estas variantes no son sustancialmente idénticos a SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, sino que incluyen sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos que afectan sustancialmente, en determinadas circunstancias, a la estructura, la función o la expresión del polipéptido descrito en el presente documento de forma que pueden obtenerse unas características mejoradas, entre las que se incluyen, p. ej., una actividad específica mejorada para hidrolizar un sustrato lignocelulósico que contiene manano, una reducción de la viscosidad más rápida cuando se utiliza para tratar sustratos de biomasa de alto contenido en sólidos, una expresión mejorada en un organismo hospedador deseable, una termoestabilidad mejorada, estabilidad de pH, etc., en comparación con las de un polipéptido de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

20 **[0119]** En algunos modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 recombinante (incluyendo una variante del mismo) tiene actividad de beta-mananasa. La actividad de beta-mananasa puede determinarse utilizando un ensayo que mida la liberación de azúcares reductores de un sustrato de galactomanano, por ejemplo, según la descripción del ejemplo 5. La actividad de beta-mananasa puede determinarse mediante la combinación con una mezcla de celulasa y/o hemicelulasa, seguida de la utilización de dicha mezcla para tratar un sustrato de biomasa adecuado que contenga manano como, por ejemplo, un sustrato leñoso, etc., según los protocolos y condiciones descritos, por ejemplo, en el ejemplo 9; o de ensayos, o métodos de medición de la actividad adecuados conocidos en el ámbito de especialización.

25 **[0120]** Los polipéptidos Pkr Man3 recombinantes incluyen fragmentos de polipéptidos Pkr Man3 "de longitud completa" que retienen actividad de beta-mananasa. Preferiblemente, estos fragmentos funcionales (esto es, los fragmentos que retienen actividad de beta-mananasa) tienen una longitud de al menos 80 residuos de aminoácidos (p. ej., una longitud de al menos 80 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 120 residuos de aminoácidos, al menos 140 residuos de aminoácidos, al menos 160
30 residuos de aminoácidos, al menos 180 residuos de aminoácidos, al menos 200 residuos de aminoácidos, al menos 220 residuos de aminoácidos, al menos 240 residuos de aminoácidos, al menos 260 residuos de aminoácidos, al menos 280 residuos de aminoácidos, al menos 300 residuos de aminoácidos o mayor). De forma adecuada, dichos fragmentos retienen el sitio activo de los polipéptidos precursores de longitud completa o de los polipéptidos maduros de longitud completa, pero pueden tener deleciones de residuos de aminoácidos no críticos. La actividad de los fragmentos puede determinarse fácilmente utilizando los métodos de medición de la actividad de beta-mananasa aquí descritos, por ejemplo, el ensayo descrito en el ejemplo 5, y las mediciones de rendimiento de hidrólisis como las descritas en el ejemplo 9, o mediante ensayos u otros medios de medición de la actividad adecuados conocidos en el ámbito de especialización.

40 **[0121]** En algunos modos de realización, las secuencias de aminoácidos Pkr Man3 y derivados se producen como una proteína de fusión de N-terminal y/o C-terminal, por ejemplo para ayudar en la extracción, detección y/o purificación, y/o para añadir propiedades funcionales a los polipéptidos Pkr Man3. Entre los ejemplos de pareja (*partner*) de la proteína de fusión se incluyen, sin carácter limitativo, glutatión-S-transferasa (GST), 6XHis, GAL4, (dominios de activación transcripcional y/o vinculantes del ADN), etiquetas FLAG- o MYC-, u otras etiquetas conocidas por los expertos en la materia. En algunos modos de realización, se proporciona un sitio de escisión proteolítica entre la pareja (*partner*) de la proteína de fusión y la secuencia polipeptídica de interés para permitir la eliminación de secuencias de fusión. De forma adecuada, la proteína de fusión no dificulta la actividad del polipéptido Pkr Man3 recombinante. En algunos modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 recombinante se fusiona con un dominio funcional que incluye un péptido líder, propéptido, dominio vinculante y/o dominio catalítico. Las proteínas de fusión están ligadas de forma opcional con el polipéptido Pkr Man3 recombinante a través de una secuencia de enlace que une el polipéptido Pkr Man3 y el dominio de fusión sin afectar de forma significativa a las propiedades de ningún componente. Opcionalmente, el enlace contribuye de forma funcional a la aplicación prevista.

55 **[0122]** La presente exposición proporciona células huésped que están modificadas para expresar uno o más polipéptidos Pkr Man3 de la exposición. Entre las células huésped adecuadas se incluyen las células de cualquier microorganismo (p. ej., células de una bacteria, un protista, un alga, un hongo (p. ej., una levadura o un hongo filamentoso), u otro microbio), y son preferiblemente células de una bacteria, una levadura o un hongo filamentoso.

[0123] Entre las células huésped adecuadas de géneros bacterianos se incluyen, sin carácter limitativo, células de *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Entre las células adecuadas de especies bacterianas se incluyen, sin carácter limitativo, células de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptomyces lividans*.

5 **[0124]** Entre las células huésped adecuadas de géneros de levaduras se incluyen, sin carácter limitativo, células de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, y *Phaffia*. Entre las células adecuadas de especies de levaduras se incluyen, sin carácter limitativo, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *P. canadensis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Phaffia rhodozyma*.

10 **[0125]** Entre las células huésped adecuadas de hongos filamentosos se incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycotina*. Entre las células adecuadas de géneros de hongos filamentosos se incluyen, sin carácter limitativo, células de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Corynascus*, *Chaetomium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Mucor*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*,
15 *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Scytalidium*, *Schizophyllum*, *Sporotrichum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* y *Trichoderma*.

[0126] Entre las células adecuadas de especies de hongos filamentosos se incluyen, sin carácter limitativo, células de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*,
20 *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Neurospora intermedia*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium canescens*, *Penicillium solitum*, *Penicillium funiculosum* *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Talaromyces flavus*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride*.
25
30

[0127] En este ámbito de especialización, se conocen métodos para transformar ácidos nucleicos en estos organismos. Por ejemplo, un procedimiento adecuado para transformar células huésped de *Aspergillus* se describe en EP 238 023.

[0128] En algunos modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 recombinante se fusiona con un péptido señal para, por ejemplo, facilitar la secreción extracelular del polipéptido Pkr Man3 recombinante. Por ejemplo, en determinados modos de realización, el péptido señal es un péptido señal no nativo como el péptido señal AprE de *B. subtilis* de SEQ ID NO: 12. En algunos modos de realización, el polipéptido Pkr Man3 tiene una extensión N-terminal de Ala-Gly-Lys entre la forma madura y el polipéptido señal. En modos de realización concretos, el polipéptido Pkr Man3 recombinante se expresa en un organismo heterólogo como un polipéptido secretado. Las composiciones y métodos del presente documento abarcan así métodos para expresar un polipéptido Pkr Man3 como un polipéptido secretado en un organismo heterólogo.
35
40

[0129] La exposición también proporciona casetes y/o vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos descritos anteriormente. De forma adecuada, el ácido nucleico que codifica un polipéptido Pkr Man3 de la exposición está ligado de forma operativa a un promotor. En el ámbito de especialización, los promotores son bien conocidos. Cualquier promotor que funcione en la célula huésped puede utilizarse para la expresión de una beta-mananasa y/o cualquiera de los otros ácidos nucleicos de la presente exposición. Los promotores o las regiones de control de iniciación, que son útiles para controlar la expresión de ácidos nucleicos de beta-mananasa y/o cualquiera de los otros ácidos nucleicos de la presente exposición en varias células huésped, son numerosos y conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, WO 2004/033646 y las referencias ahí citadas). Virtualmente, puede utilizarse cualquier promotor capaz de controlar estos ácidos nucleicos.
45
50

[0130] De forma concreta, cuando se desea una expresión recombinante en un huésped fúngico filamentosos, el promotor puede ser un promotor fúngico filamentosos. Los ácidos nucleicos pueden estar, por ejemplo, bajo el control de promotores heterólogos. Los ácidos nucleicos también pueden expresarse bajo el control de promotores constitutivos e inducibles. Entre los ejemplos de promotores que pueden utilizarse se incluyen, sin carácter limitativo, un promotor de celulasa, un promotor de xilanasas, el promotor 1818 (identificado previamente como una proteína altamente expresada por marcadores de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) que mapean *Trichoderma*). Por ejemplo, de forma adecuada el promotor puede ser un promotor celobiohidrolasa,
55

endoglucanasa o beta-glucosidasa. Un promotor especialmente adecuado puede ser, por ejemplo, un promotor de celobiohidrolasa, endoglucanasa o beta-glucosidasa de *T. reesei*. Por ejemplo, el promotor es un promotor de celobiohidrolasa I (*cbh1*). Entre los ejemplos no limitativos de promotores se incluye un promotor de *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4*, *egl5*, *pki1*, *gpd1*, *xyn1*, o *xyn2*. Algunos ejemplos adicionales no limitativos de promotores incluyen un promotor de *cbh1*, *cbh2*, *egll*, *egl2*, *egl3*, *egl4*, *egl5*, *pki1*, *gpd1*, *xyn1*, o *xyn2* de *T. reesei*.

[0131] La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido Pkr Man3 según el presente documento puede incluirse en un vector. En algunos aspectos, el vector contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido Pkr Man3 bajo el control de una secuencia de control de expresión. En algunos aspectos, la secuencia de control de expresión es una secuencia de control de expresión nativa. En algunos aspectos, la secuencia de control de expresión es una secuencia de control de expresión no nativa. En algunos aspectos, el vector contiene un marcador selectivo o marcador de selección. En algunos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido Pkr Man3 se integra en un cromosoma de una célula huésped sin un marcador de selección.

[0132] Son vectores adecuados aquellos que son compatibles con la célula huésped empleada. Los vectores adecuados pueden derivarse, por ejemplo, de una bacteria, un virus (como bacteriófago T7 o un fago derivado M-13), un cósmido, una levadura, o una planta. Los vectores adecuados pueden mantenerse en la célula huésped en un número de copias bajo, medio o elevado. Los expertos en la materia conocen protocolos para obtener y utilizar dichos vectores (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor, 1989).

[0133] En algunos aspectos, el vector de expresión también incluye una secuencia de terminación. Las regiones de control de la terminación también pueden derivarse de varios genes nativos de la célula huésped. En algunos aspectos, la secuencia de terminación y la secuencia promotora se derivan de la misma fuente.

[0134] Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido Pkr Man3 puede incorporarse a un vector, como un vector de expresión, por medio de técnicas estándares (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982).

[0135] En algunos aspectos, puede ser deseable sobreexpresar un polipéptido Pkr Man3 y/o uno o más de cualquier otro ácido nucleico descrito en la presente exposición a niveles mucho mayores que los que se encuentran actualmente en células de origen natural. En algunos modos de realización, puede ser deseable infraexpresar (p. ej., mutar, inactivar o deleccionar) una beta-mananasa endógena y/o uno o más de cualquier otro ácido nucleico descrito en la presente exposición a niveles mucho menores que los que se encuentran actualmente en células de origen natural.

B. Polinucleótidos que codifican Pkr Man3

[0136] En el presente documento, se expone un polinucleótido o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido Pkr Man3 recombinante (incluyendo variantes y fragmentos del mismo) que tiene actividad de beta-mananasa. El polinucleótido puede proporcionarse en el contexto de un vector de expresión para dirigir la expresión de un polipéptido Pkr Man3 en un organismo heterólogo, como uno identificado en el presente documento. El polinucleótido que codifica un polipéptido Pkr Man3 recombinante puede estar ligado de forma operativa a elementos reguladores (p. ej., un promotor, terminador, potenciador, y similares) para asistir en la expresión de polipéptidos codificados.

[0137] Un ejemplo de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido Pkr Man3 recombinante tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1. De forma natural, pueden darse polinucleótidos similares y sustancialmente idénticos que codifican polipéptidos Pkr Man3 recombinantes, así como variantes de los mismos, p. ej., en otras cepas o cepas aisladas de *Paenibacillus kribbensis*, o *Paenibacillus sp.* En vista de la degeneración del código genético, se apreciará que los polinucleótidos que tienen distintas secuencias nucleotídicas pueden codificar los mismos polipéptidos, variantes o fragmentos Pkr Man3.

[0138] Los polinucleótidos que codifican polipéptidos Pkr Man3 recombinantes pueden tener un grado específico de identidad de secuencia de aminoácidos con el polinucleótido ejemplificado que codifica un polipéptido Pkr Man3, p. ej., al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o incluso al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o con la secuencia madura de SEQ ID NO:3. La homología se puede determinar mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos, p. ej., utilizando un programa como BLAST, ALIGN o CLUSTAL, como se ha descrito en el presente documento.

[0139] El polinucleótido que codifica un polipéptido Pkr Man3 recombinante puede fusionarse dentro del marco de lectura tras (esto es, en dirección 3' de) una secuencia codificadora para un péptido señal para dirigir la secreción extracelular de un polipéptido Pkr Man3 recombinante. Tal como se describe en el presente documento, el término "heterólogo", cuando se utiliza para hacer referencia a una secuencia señal utilizada para expresar un polipéptido de interés, se quiere decir que la secuencia señal y el polipéptido de interés son de organismos distintos. Entre las secuencias señal heterólogas se incluyen, por ejemplo, las de otros genes de celulasas fúngicas como, p. ej., la secuencia señal de *Trichoderma reesei* CBH1. Los vectores de expresión pueden proporcionarse en una célula huésped heteróloga adecuada para expresar un polipéptido Pkr Man3 recombinante, o adecuada para propagar el vector de expresión antes de introducirlo en una célula huésped adecuada.

[0140] Los polinucleótidos que codifican polipéptidos Pkr Man3 recombinantes pueden hibridarse con el polinucleótido de SEQ ID NO: 1 (o con el complemento del mismo) en condiciones de hibridación específicas. Algunos ejemplos de condiciones son condiciones de astringencia intermedia, de astringencia elevada, y de astringencia extremadamente elevada, las cuales se describen en el presente documento.

[0141] Los polinucleótidos Pkr Man3 pueden ser de origen natural o sintéticos (esto es, artificiales), y sus codones pueden optimizarse para expresarse en un huésped distinto, mutarse para introducir sitios de clonación, o alterarse de otra forma para añadir funcionalidad.

[0142] La secuencia de ácido nucleico que codifica la región codificadora del polipéptido Pkr Man3 derivado de *Paenibacillus kribbensis* es la siguiente (SEQ ID NO: 1), donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de péptido señal prevista se encuentra en cursiva:

GTGAGAGATTGGCGTCTTTATGGCAAAAAGGCTTTCATCTTACTATTATTTTTCTGCTTTG
TTCCAGTGTAGGGTATTGAATGCAGGTACATCATTGCAGCCTCCGGTTTTTATGTAAG
 CGGAAACAATTTGAAGGATGCCAATGGGAACAACCTTTGTGATGCGCGGGGTGAACA
 ACCCTCATATCTGGTTTGACGCACAAGCCTATCAGGCATTGGATGCGATTGCTGCGA
 CGAAGTCCAACACCGTCCGCATTGTGTGGCAAACCAATGGATCGGCGCAAAGACTC
 GGAGAGATCATCGAACGGGCCAAACAGCTCAAGCTGATTTCCGTGGTTGAGCTGCA
 CGACGTGACTGGCAGCAATGATGCCAACCGTTTTGAACGACATGGCCCCGTTATTTTCG
 CTGACCCAGCGGTGAAAAAATACTGGCCGATAATCAGAAGTACGTCCTCGTGAAT
 ATCGCCAATGAATGGGGCGACCACAACCTCTCGGATGCCGCATGGCGGGACGCTTA
 CAAAACCTGCAATTACCACCCTGCGAAACGCAGGTGTGCCAAATACAATTGTGATCG
 ACGGCTCCGGCTGGGGACAATATGCTTCCCCGATCAAGGCCACGGCGTAGAGCTG
 CTGCAACACGATCCCAACCATAACATCTTATTTCCGTCCATATGTATGCCAACTAT
 AATGATTCAGTAAAATCGGCTCTGAGCTGCAGGCCATCAAGGACAAGGGGCTGGC
 GGTCATCGTGGGTGAGTTTGGCTACAACATAACAATGGCAACAACAACCTGGGCA
 CCACCGTGAATCCTTACGAGGTCATGAAGCAGTCTCAAGCCAAAGGCATCGGCTAT
 CTGGCCTGGTCTTGGACGGGCAACAACAGTGAAAACGCATGGCTTGATCTCGTGAA
 CAGCAGTGACTGGAAAACGCCAACCGCATGGGGAAATACTGTGTTAATGATGTCA
 ACGGCATCAAAAACACTTCGAAGAAAGCTTCGGTTTTAC

C. Purificación a partir de cepas aisladas naturales

[0143] Los polipéptidos Pkr Man3 pueden purificarse a partir de cepas aisladas naturales (p. ej., a partir de una cepa de *Paenibacillus kribbensis*) mediante métodos conocidos y empleados comúnmente. Por ejemplo, las células que contienen un polipéptido Pkr Man3 pueden ser alteradas mediante varios medios físicos o químicos, como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica, o agentes lisantes de células. Pueden recogerse sobrenadantes de células (por ejemplo, de células que secretan la proteína en el medio). El polipéptido Pkr Man3 puede recuperarse del medio y/o lisarse mediante técnicas convencionales que incluyen separaciones de las células/restos del medio mediante centrifugación, filtración y precipitación de las proteínas

- en el sobrenadante o filtrado con una sal, por ejemplo, sulfato de amonio. Entonces, el polipéptido Pkr Man3 puede ser purificado de las células alteradas mediante procedimientos como: fraccionamiento en una columna de intercambio de iones; precipitación etanólica; HPLC con inversión de fase; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio de iones como DEAE; cromatoenfoco; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración por gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; y cromatografía de afinidad. Pueden emplearse varios métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en el ámbito de especialización y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982).

D. Síntesis química

- 10 [0144] De forma alternativa, la secuencia polipeptídica Pkr Man3, o partes de la misma, puede producirse por síntesis de péptidos directa utilizando técnicas en fase sólida (véase, .ej., Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas *in vitro* puede realizarse utilizando técnicas manuales o mediante automatización. Puede conseguirse una síntesis automatizada, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos (Peptide Synthesizer) de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente varias partes de Pkr Man3 de forma separada y combinarse utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir un Pkr Man3 de longitud completa.

E. Métodos recombinantes de elaboración

Aislamiento de ADN que codifica el polipéptido Pkr Man3

- 20 [0145] El ADN que codifica un polipéptido Pkr Man3 puede obtenerse de un banco de ADNc preparado a partir de un organismo del que se considera que posee el ARNm de Pkr Man3 (p. ej., *Paenibacillus kribbensis*) y que lo expresa a un nivel detectable. El gen que codifica Pkr Man3 también puede obtenerse de un banco genómico o por síntesis de oligonucleótidos.

- 25 [0146] Los bancos pueden cribarse con sondas (como anticuerpos de un Pkr Man3 u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o el banco genómico con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándares, como se describe en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Una forma alternativa para aislar el gen que codifica Pkr Man3 es utilizar metodología de PCR (Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)).

- 30 [0147] En técnicas conocidas para el cribado de un banco de ADNc, las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían poseer una longitud suficiente y ser suficientemente inequívocas para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido puede marcarse de forma que pueda ser detectado tras la hibridación con ADN en el banco que se está cribando. Los métodos de marcaje son bien conocidos en el ámbito de especialización, e incluyen el uso de marcajes radiactivos como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. Se proporcionan condiciones de hibridación, que incluyen astringencia moderada y astringencia elevada, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

- 35 [0148] Pueden obtenerse ácidos nucleicos que tengan secuencia codificadora de proteínas mediante el cribado de ADNc o bancos genómicos seleccionados utilizando la secuencia de aminoácidos deducida aquí expuesta por primera vez y, en caso de ser necesario, utilizando procedimientos de extensión con cebadores convencionales como se describe en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que puedan no haber sido retrotranscritos a ADNc.

- 40 [0149] Selección y transformación de células huésped

- 45 [0149] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación aquí descritos para la producción de Pkr Man3. Las células huésped se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, como el medio, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionados por el experto en la materia sin experimentación indebida. En general, pueden hallarse principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

[0150] El experto en la materia conoce métodos de transfección, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándares adecuadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico, como se describe en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), o la electroporación se utilizan generalmente para procariontas u otras células que contienen paredes celulares sustanciales. Se utiliza la infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de determinadas células vegetales, como se describe en Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859, publicada el 29 de junio de 1989. Las transformaciones en levadura se pueden llevar a cabo según el método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)*, 76:3829 (1979). No obstante, también pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células, como microinyección nuclear, electroporación, bombardeo de microproyectiles, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policondones, p. ej., polibreno, poliornitina.

[0151] Entre las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores expuestos en el presente documento se incluyen células fúngicas filamentosas, de levadura o procariontas. Entre las células procariontas adecuadas se incluyen, sin carácter limitativo, las eubacterias, como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacteriáceas como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, como la cepa K12 (ATCC 31,446) de *E. coli* MM294; *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); las cepas W3110 (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53,635) de *E. coli*. Además de los procariontas, los microorganismos eucariotas como la levadura o los hongos filamentosos son huéspedes de expresión o clonación adecuados para vectores que codifican polipéptidos Pkr Man3. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior comúnmente utilizado.

[0152] El microorganismo que se va a transformar puede incluir una cepa derivada de *Trichoderma* spp. o *Aspergillus* spp. Entre los ejemplos de cepas se incluyen *T. reesei*, que es útil para obtener proteínas sobreexpresadas, o *Aspergillus niger* var. *awamori*. Por ejemplo, se sabe que la cepa RL-P37 de *Trichoderma*, descrita por Sheir-Neiss *et al.* en *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 20 (1984) pp. 46-53 secreta elevadas cantidades de enzimas de celulasa. Entre los equivalentes funcionales de RL-P37 se incluyen la cepa RUT-C30 (núm. ATCC 56765) y la cepa QM9414 (núm. ATCC 26921) de *Trichoderma reesei* (*longibrachiatum*). Otro ejemplo incluye mutantes superproductores, como se describe en Ward *et al.* en *Appl. Microbiol. Biotechnology* 39:738-743 (1993). Por ejemplo, se contempla que estas cepas también serían útiles para sobreexpresar un polipéptido Pkr Man3 de *Paenibacillus kribbensis*, o una variante del mismo. La selección de la célula huésped adecuada se incluye dentro de los conocimientos del ámbito de especialización.

Preparación y uso de un vector replicable

[0153] El ADN que codifica la proteína Pkr Man3 o derivados de la misma (como se ha descrito anteriormente) se prepara para su inserción en el microorganismo adecuado. Según la presente exposición, el ADN que codifica un polipéptido Pkr Man3 incluye todo el ADN necesario para codificar una proteína que tiene una actividad Pkr Man3 funcional. Como tal, el ADN que codifica un polipéptido Pkr Man3 puede derivarse de *Paenibacillus* sp., incluyendo *Paenibacillus kribbensis*.

[0154] El ADN que codifica Pkr Man3 puede prepararse mediante la construcción de un vector de expresión que porta el ADN que codifica Pkr Man3. El vector de expresión que porta el fragmento de ADN insertado que codifica el Pkr Man3 puede ser cualquier vector que sea capaz de replicarse de forma autónoma en un organismo hospedador determinado o de integrarse en el ADN del huésped, típicamente un plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. Varios vectores se encuentran disponibles públicamente. También se contempla que más de una copia de ADN que codifica un Pkr Man3 pueda recombinarse en la cepa para facilitar la sobreexpresión.

[0155] En determinados casos, las secuencias de ADN para expresar Pkr Man3 incluyen el promotor, la región codificadora de genes, y la secuencia terminadora, todas originadas a partir del gen nativo que se va a expresar. El truncamiento de genes puede obtenerse delecionando secuencias de ADN no deseadas (p. ej., codificación para dominios no deseados) para dejar el dominio que se va a expresar bajo el control de sus secuencias reguladoras de transcripción y traducción nativas. Un marcador de selección también puede estar presente en el vector, lo que permite la selección de múltiples copias de secuencias de genes Pkr Man3 para su integración en el huésped.

[0156] En otros casos, el vector de expresión se ensambla previamente y contiene secuencias necesarias para transcripción de alto nivel y, en algunos casos, un marcador de selección. Se contempla que la región codificadora para un gen o una parte del mismo pueda insertarse en este vector de expresión de uso general de forma que se encuentre bajo el control transcripcional del promotor de casetes de expresión y las secuencias terminadoras. Por ejemplo, pTEX es un vector de expresión de uso general de este tipo. Pueden insertarse genes o partes de los mismos en dirección 3' del promotor *cbh1* fuerte.

[0157] En el vector, la secuencia de ADN que codifica el Pkr Man3 de las presentes composiciones y métodos debería estar ligada de forma operativa a secuencias de transcripción y traducción, p. ej., una secuencia promotora y una secuencia señal adecuadas en marco de lectura del gen estructural. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad de transcripción en la célula huésped y puede derivarse de genes que codifican proteínas tanto homólogas como heterólogas con respecto a la célula huésped. El péptido señal hace posible la producción extracelular (secreción) del Pkr Man3 o de derivados del mismo. El ADN que codifica la secuencia señal puede ser el que se asocia de forma natural con el gen que se va a expresar. Sin embargo, en las presentes composiciones y métodos se contempla la secuencia señal procedente de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, una exo-celobiohidrolasas o endoglucanasa de *Trichoderma*, una xilanasas de una especie bacteriana, p. ej., de *Streptomyces coelicolor*, etc.

[0158] La secuencia de ácido nucleico adecuada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un(os) sitio(s) de endonucleasas de restricción adecuados utilizando técnicas conocidas en el ámbito de especialización. Por lo general, entre los componentes vectoriales se incluyen, sin carácter limitativo, una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento estándares que son conocidas por el experto en la materia.

[0159] Un polipéptido Pkr Man3 deseado puede ser producido de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte del ADN que codifica Pkr Man3 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasas, lpp o enterotoxina resistente al calor II líderes. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal puede ser, p. ej., la invertasa de levadura líder, factor alfa líder (incluyendo factores α líderes de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, descrita esta última en la patente de los Estados Unidos con número 5,010,182), o fosfatasa ácida líder, la glucoamilasa líder de *C. albicans* (EP 362,179, publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990.

[0160] Tanto los vectores de expresión como los de clonación pueden contener una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas y el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levadura.

[0161] Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente un gen de selección, también denominado marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina; (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, p. ej., el gen que codifica la D-alanina-racemasa para *Bacilli*. Un gen de selección adecuado para ser utilizado en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, la núm. ATCC. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). Un ejemplo de gen de selección para su utilización en *Trichoderma sp* es el gen *pyr4*.

[0162] Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor ligado de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico que codifica Pkr Man3. El promotor dirige la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales son bien conocidos. Los promotores incluyen una secuencia promotora fúngica, por ejemplo, el promotor del gen *cbh1* o *egl1*.

[0163] Los promotores adecuados para su utilización con huéspedes procariotas incluyen los sistemas promotores de β -lactamasas y lactosa (Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281:544 (1979)), fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776), y promotores híbridos como el promotor *tac* (de Boer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)). Algunos promotores adicionales, p. ej., el promotor A4 de *A. niger*, también son utilizados en sistemas de expresión bacterianos, p. ej., en *S. lividans*. Los promotores que se utilizan en sistemas bacterianos también pueden contener una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada de forma operativa al ADN que codifica un polipéptido Pkr Man3.

[0164] Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura se incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)) u otras

- enzimas glucolíticas (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)), como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosa fosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa. Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol-deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. En EP 73,657, se describen con más detalle los promotores y vectores adecuados para su utilización en la expresión en levaduras.
- 10 **[0165]** Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (p. ej., levadura, hongos, insectos, plantas) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles comúnmente en las regiones 5', y ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc virales o eucariotas. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte sin traducir del ARNm que codifica un polipéptido Pkr Man3.

Purificación de un polipéptido pkr man3

- [0166]** Pueden recuperarse formas de polipéptidos Pkr Man3 (o de derivados de polipéptido Pkr Man3) del medio de cultivo o de lisados de células huésped mediante los métodos descritos anteriormente para el aislamiento y la purificación a partir de cepas aisladas naturales. Pueden utilizarse técnicas adicionales dependiendo de la célula huésped empleada y de cualquier estructura variante en la enzima recombinante. Por ejemplo, si la enzima recombinante está limitada por membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una disolución detergente adecuada (p. ej. Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. La purificación de enzima recombinante también puede emplear columnas de proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes como IgG y columnas quelantes de metal para unir formas marcadas por epítipo del polipéptido Pkr Man3. La(s) fase(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado, del polipéptido Pkr Man3 concreto que se produce, y de cualquier estructura variante para la enzima recombinante. También pueden emplearse los anticuerpos dirigidos a un polipéptido Pkr Man3 o las etiquetas de epítipo en el mismo para purificar la proteína, p. ej., anticuerpos anti Pkr Man3 unidos a un soporte sólido.

4. Derivados de pkr man3

- 30 **[0167]** Como se ha descrito anteriormente, además de la secuencia nativa de Pkr Man3 descrita en el presente documento (p. ej., como se representa de forma completa en SEQ ID NO:2, y en la forma madura en SEQ ID NO: 3), se contempla que los derivados de Pkr Man3 pueden prepararse con secuencias de aminoácidos alteradas. En general, los derivados de Pkr Man3 serían capaces, como un polipéptido Pkr Man3 nativo, de conferir a una mezcla o composición de celulosa y/o hemicelulasa, bien una capacidad mejorada de hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica, especialmente uno que contenga manano, bien una capacidad mejorada de reducir la viscosidad de una mezcla de sustrato de biomasa, especialmente uno que se encuentra a niveles de sólidos elevados, o ambas. Dichos derivados pueden elaborarse, por ejemplo, para mejorar la expresión en un huésped concreto, mejorar la secreción (p. ej., alterando la secuencia señal), para introducir etiquetas de epítipo u otras secuencias que puedan facilitar la purificación y/o el aislamiento de polipéptidos Pkr Man3. En algunos modos de realización, los derivados pueden conferir más capacidad de hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica a una mezcla o composición de celulosa y/o hemicelulasa, en comparación con el polipéptido Pkr Man3 nativo. En algunos modos de realización, los derivados pueden conferir un mayor beneficio de reducción de la viscosidad (p. ej., una mejora o una velocidad y/o un grado de reducción de la viscosidad incluso mayores) a una mezcla de celulosa y/o hemicelulasa, en comparación con el polipéptido Pkr Man3 nativo.
- 45 **[0168]** Los derivados de polipéptido Pkr Man3 pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ADN que codifica Pkr Man3, o mediante la síntesis de los polipéptidos Pkr Man3 deseados. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos postraduccionales de los polipéptidos Pkr Man3, como cambiando el número o la posición de los sitios de glicosilación.
- 50 **[0169]** Los derivados del polipéptido Pkr Man3 de secuencia nativa o de varios dominios del Pkr Man3 descritos en el presente documento pueden elaborarse, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos con número 5,364,934. Las variaciones de la secuencia pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido Pkr Man3 que tenga como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido Pkr Man3 en comparación con la secuencia nativa del polipéptido Pkr Man3. De forma opcional, la variación de la secuencia se produce por la sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido Pkr Man3.

[0170] Para determinar qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar negativamente a la actividad de beta-mananasa Pkr Man3 deseada, puede encontrarse orientación comparando la secuencia del polipéptido con la de moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en las regiones de elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido con propiedades estructurales y/o químicas similares, como el reemplazo de una leucina por una serina, esto es, reemplazos de aminoácidos conservativos. Opcionalmente, las inserciones o deleciones pueden encontrarse en el rango de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo, de forma sistemática, inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y examinando la actividad funcional de los derivados resultantes utilizando técnicas conocidas en el ámbito de especialización.

[0171] Las variaciones de secuencia pueden realizarse utilizando métodos conocidos en el ámbito de especialización, como mutagénesis (de sitio dirigido) dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis por PCR y barrido de alanina. La mutagénesis de sitio dirigido (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), la mutagénesis por inserción de un casete (Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)), la mutagénesis de selección por restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)) u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN que codifica el Pkr Man3 con una variación de secuencia.

[0172] También puede emplearse un análisis mediante aminoácidos de barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido se encuentran aminoácidos relativamente pequeños y neutros. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina suele utilizarse como un aminoácido de barrido en este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del beta-carbono y tiene menos probabilidades de alterar la conformación de la cadena principal del derivado. La alanina se suele usar también porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones ocultas como expuestas (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)). Si la sustitución con alanina no produce cantidades de variantes adecuadas, puede utilizarse un aminoácido isostérico.

5. Anticuerpos anti pkr man3

[0173] La presente exposición proporciona también anticuerpos anti Pkr Man3. Entre los ejemplos de anticuerpos se incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, incluyendo anticuerpos quiméricos y humanizados.

[0174] Los anticuerpos anti Pkr Man3 pueden incluir anticuerpos policlonales. Puede emplearse cualquier método conveniente para generar y preparar anticuerpos policlonales y/o monoclonales, un número de los cuales son conocidos por los expertos en la materia.

[0175] También pueden generarse anticuerpos anti Pkr Man3 utilizando métodos de ADN recombinante, como los descritos en la patente de los Estados Unidos con número 4,816,567.

[0176] Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes, que pueden ser generados mediante métodos recombinantes o mediante la digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, concretamente, fragmentos Fab.

D. Medios de cultivo celular

[0177] Por lo general, el microorganismo se cultiva en un medio de cultivo celular adecuado para la producción de los polipéptidos Pkr Man3 descritos en el presente documento. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno, así como sales inorgánicas, utilizando procedimientos y variaciones conocidas en el ámbito de especialización. En el ámbito de especialización, se conocen medios de cultivo, rangos de temperatura y otras condiciones de crecimiento y producción de celulasas adecuados. Como ejemplo no limitativo, un rango de temperatura típico para la producción de celulasas a partir de *Trichoderma reesei* es de 24 °C a 37 °C, por ejemplo, entre 25 °C y 30 °C.

a. Condiciones de cultivo celular

[0178] En el ámbito de especialización, se conocen bien los materiales y métodos adecuados para el mantenimiento y el crecimiento de cultivos de hongos. En algunos aspectos, las células se cultivan en un medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión de uno o más polipéptidos de beta-mananasa codificados por un ácido nucleico insertado en las células huésped. Para cultivar las células, pueden utilizarse condiciones de cultivo celular estándares. En algunos aspectos, el crecimiento y el mantenimiento de las células se produce

con una temperatura, una mezcla de gases y un pH adecuados. En algunos aspectos, el crecimiento de las células se produce en un medio celular adecuado.

6. Composiciones que comprenden un polipéptido Pkr Man3 de beta-mananasa recombinante

5 [0179] La presente exposición proporciona composiciones de enzimas modificadas (p. ej., composiciones de celulasas) o caldos de fermentación enriquecidos con un polipéptidos Pkr Man3 recombinantes. En algunos aspectos, la composición es una composición de celulasas. La composición de celulasas puede ser, p. ej., una composición de celulasas fúngica filamentosa, como una composición de celulasas de *Trichoderma*. La composición de celulasas puede ser, en algunos modos de realización, una adición o mezcla física de varias celulasas originadas a partir de distintos microorganismos; o puede ser una que sea el caldo de cultivo de un solo microbio modificado que coexpresa los genes de celulasas; o puede ser una que sea la adición de una o más celulasas obtenidas individualmente/por separado a una mezcla que sea el caldo de cultivo de un microbio modificado que coexpresa uno o más genes de celulasas.

15 [0180] En algunos aspectos, la composición es un caldo de fermentación que comprende actividad de celulasas, donde el caldo es capaz de convertir en azúcares más de aproximadamente un 50 % en peso de la celulosa presente en una muestra de biomasa. Los términos "caldo de fermentación" y "caldo entero", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a un preparado enzimático producido mediante la fermentación de un microorganismo modificado que experimenta una recuperación y/o purificación mínima o nula después de la fermentación. El caldo de fermentación puede ser un caldo de fermentación de un hongo filamentoso, por ejemplo, un caldo de fermentación de *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Achlya*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochliobolus*, *Pyricularia*, *Myceliophthora* o *Chrysosporium*. En concreto, el caldo de fermentación puede ser, por ejemplo, uno de *Trichoderma spp.*, como un *Trichoderma reesei*, o de *Penicillium spp.*, como un *Penicillium funiculosum*. El caldo de fermentación también puede ser, de forma adecuada, un caldo de fermentación acelular. En un aspecto, cualquiera de las composiciones de celulasas, células, o caldo de fermentación de la presente invención puede comprender además una o más hemicelulasas.

25 [0181] En algunos aspectos, la composición de caldo entero se expresa en *T. reesei* o en una cepa modificada del mismo. En algunos aspectos, el caldo entero se expresa en una cepa integrada de *T. reesei* donde un número de celulasas que incluyen un polipéptido Pkr Man3 se han integrado en el genoma de la célula huésped de *T. reesei*. En algunos aspectos, se han delecionado uno o más componentes de los polipéptidos expresados en la cepa integrada de *T. reesei*.

30 [0182] En algunos aspectos, la composición de caldo entero se expresa en *A. niger* o en una cepa modificada del mismo.

35 [0183] De forma alternativa, los polipéptidos Pkr Man3 recombinantes pueden expresarse de forma intracelular. De forma opcional, tras la expresión intracelular de las variantes de enzimas, o la secreción en el espacio periplasmático utilizando secuencias señal como las mencionadas anteriormente, puede utilizarse una fase de permeabilización o lisis para liberar el polipéptido Pkr Man3 recombinante al sobrenadante. La alteración de la barrera de membrana se efectúa mediante el uso de medios mecánicos como ondas ultrasónicas, tratamiento con presión (prensa francesa), cavitación, o mediante el uso de enzimas que digieren membranas, como mezclas de enzimas o lisozimas.

40 [0184] En algunos aspectos, los polinucleótidos que codifican el polipéptido Pkr Man3 recombinante se expresan utilizando un sistema de expresión acelular adecuado. En sistemas acelulares, el polinucleótido de interés se transcribe normalmente con la asistencia de un promotor, pero el ligamiento para formar un vector de expresión circular es opcional. En algunos modos de realización, el ARN se añade o se genera de forma exógena sin transcripción y se traduce en sistemas acelulares.

7. Usos de los polipéptidos Pkr Man3 para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica

45 [0185] En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para convertir biomasa lignocelulósica en azúcares, comprendiendo el método el contacto del sustrato de biomasa con una composición aquí expuesta que comprende un polipéptido Pkr Man3 en una cantidad efectiva para convertir el sustrato de biomasa en azúcares fermentables. De forma adecuada, el sustrato de biomasa comprende GGM y/o GM. En determinados modos de realización, un sustrato de biomasa adecuado puede contener hasta aproximadamente un 2 % en peso o más, aproximadamente un 3 % en peso o más, aproximadamente un 4 % en peso o más, aproximadamente un 5 % en peso o más, etc. de GGM y/o GM.

[0186] En algunos aspectos, el método comprende además el pretratamiento de la biomasa con medios ácidos y/o de base y/o mecánicos u otros medios físicos. En algunos aspectos, el ácido comprende ácido fosfórico. En algunos aspectos, la base comprende hidróxido sódico o amoníaco. En algunos aspectos, los medios mecánicos pueden incluir, por ejemplo, la trituración, el prensado, el aplastamiento o la molienda u otros medios de descomponer físicamente la biomasa lignocelulósica en formas físicas más pequeñas. Otros medios físicos también pueden incluir, por ejemplo, la utilización de vapor u otro humo o vapor presurizado para "ablandar" la biomasa lignocelulósica con el fin de incrementar la accesibilidad por parte de las enzimas a la celulosa y la hemicelulosa. En determinados modos de realización, el método de pretratamiento también puede emplear enzimas capaces de descomponer la lignina del sustrato de biomasa lignocelulósica, de forma que se incremente la accesibilidad de las enzimas de la composición de enzimas que hidroliza la biomasa a la celulosa y la hemicelulosa de la biomasa.

[0187] **Biomasa:** La exposición proporciona métodos y procesos para la sacarificación de biomasa, utilizando las composiciones de enzimas de la exposición, que comprenden un polipéptido Pkr Man3. El término "biomasa", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a cualquier composición que comprende celulosa y/o hemicelulosa (de forma opcional, también lignina en materiales de biomasa lignocelulósica). Son especialmente adecuados los materiales de biomasa lignocelulósica que comprenden cantidades mensurables de galactoglucomananos (GGM) y/o glucomanano (GM). Dichos materiales de biomasa pueden incluir, por ejemplo, una pulpa de madera blanda cruda industrial pretratada con KRAFT alcalino, FPP-27, que puede obtenerse de la Agencia Nacional de la Investigación de Francia y contiene aproximadamente un 6,5 % en peso de manano; una madera blanda pretratada con SPORL (Zhu J.Y. *et al.*, (2010) Appl. Microbiol. Biotechnol. 86(5):1355-65; Tian S. *et al.*, (2010) Bioresour. Technol. 101:8678-85), que contiene aproximadamente un 4,5 % en peso de manano; píceas, que puede contener más de un 10 % en peso de manano. Tal como se utiliza en el presente documento, la biomasa incluye, sin carácter limitativo, determinados árboles de madera blanda como píceas, pinos, álamos temblones y residuos derivados de los mismos, semillas, cereales, tubérculos, residuos vegetales (como, por ejemplo, racimos de fruta vacíos de las palmeras, o residuos de fibras de palmeras) o productos secundarios resultantes de transformación alimentaria o procesos industriales (p. ej., tallos), maíz (incluyendo, p. ej., zuros, rastrojos, y similares), plantas herbáceas (incluyendo, p. ej., *Indian grass*, como *Sorghastrum nutans*; o *switchgrass*, p. ej., especies de *Panicum*, como *Panicum virgatum*), cañas perennes (p. ej., cañas comunes), madera (incluyendo, p. ej., astillas, procesado de residuos), papel, pulpa, y papel reciclado (incluyendo, p. ej., periódicos, papel para impresora, y similares). Otros materiales de biomasa incluyen, sin carácter limitativo, patatas, soja (p. ej., colza), cebada, centeno, avena, trigo, remolachas, y bagazo de caña de azúcar.

[0188] Por consiguiente, la exposición proporciona métodos de sacarificación que comprenden el contacto de una composición que comprende un material de biomasa, por ejemplo, un material que comprende xilano, hemicelulosa, y especialmente, galactoglucomananos (GGM) y/o glucomananos (GM), celulosa y/o un azúcar fermentable, con un polipéptido Pkr Man3 de la exposición, o un polipéptido Pkr Man3 codificado por un ácido nucleico o polinucleótido de la exposición, o cualquiera de las composiciones de celulosa y/o hemicelulosa de origen no natural que comprenden un polipéptido Pkr Man3, o productos de fabricación de la exposición.

[0189] La biomasa sacarificada (p. ej., material lignocelulósico procesado por enzimas de la exposición) puede transformarse en un número de productos bióticos, mediante procesos como, p. ej., fermentación microbiana y/o síntesis química. Tal como se utiliza en el presente documento, "fermentación microbiana" se refiere a un proceso de cultivo y cosecha de microorganismos fermentadores en condiciones adecuadas. El microorganismo fermentador puede ser cualquier microorganismo adecuado para utilizarse en un proceso de fermentación adecuado para la producción de productos bióticos. Entre los microorganismos fermentadores adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, los hongos filamentosos, la levadura y las bacterias. La biomasa sacarificada puede, por ejemplo, transformarse en un combustible (p. ej., un biocombustible como un bioetanol, biobutanol, biometanol, un biopropanol, un biodiésel, un carburante, o similares) mediante fermentación y/o síntesis química. La biomasa sacarificada también puede, por ejemplo, transformarse en un producto químico básico (p. ej., ácido ascórbico, isopreno, 1,3-propanodiol), lípidos, aminoácidos, polipéptidos y enzimas mediante fermentación y/o síntesis química.

[0190] **Pretratamiento:** Antes de la sacarificación o la hidrólisis enzimática y/o la fermentación de los azúcares fermentables resultantes de la sacarificación, la biomasa (p. ej., un material lignocelulósico) se somete preferiblemente a una o más fases de pretratamiento con el fin de hacer el xilano, la hemicelulosa, la celulosa y/o el material de lignina más accesibles o susceptibles a las enzimas en la composición enzimática (por ejemplo, la composición enzimática de la presente invención, que comprende un polipéptido Pkr Man3) y, en consecuencia, más modificables mediante hidrólisis por parte de la(s) enzima(s) y/o las composiciones de enzimas.

[0191] En algunos aspectos, un método de pretratamiento adecuado puede implicar el sometimiento del material de biomasa a un catalizador que comprende una solución diluida de un ácido fuerte y una sal metálica en un reactor. El material de biomasa puede ser, p. ej., una materia prima o un material seco. Este pretratamiento puede bajar la energía de activación, o la temperatura, de la hidrólisis de la celulosa, permitiendo finalmente

producciones más elevadas de azúcares fermentables. Véase, p. ej., las patentes de los Estados Unidos con número 6,660,506; 6,423,145.

5 **[0192]** En algunos aspectos, un método de pretratamiento adecuado puede implicar el sometimiento del material de biomasa a una primera fase de hidrólisis en un medio acuoso a una temperatura y una presión elegidas para efectuar principalmente la despolimerización de la hemicelulosa sin obtener una despolimerización significativa de la celulosa a glucosa. Esta fase produce una suspensión en la que la fase acuosa líquida contiene monosacáridos disueltos resultantes de la despolimerización de la hemicelulosa, y una fase sólida que contiene celulosa y lignina. Entonces, la suspensión se somete a una segunda fase de hidrólisis en condiciones que permiten la despolimerización de una parte importante de la celulosa, produciendo una fase acuosa líquida que
10 contiene productos de la despolimerización de la celulosa disueltos/solubles. Véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número 5,536,325.

15 **[0193]** En otros aspectos, un método de pretratamiento adecuado puede implicar el procesamiento de un material de biomasa mediante una o más etapas de hidrólisis con ácido diluido utilizando aproximadamente de un 0,4 % a aproximadamente un 2 %; seguido del tratamiento del componente lignocelulósico sólido no reactivado del material hidrolizado ácido con deslignificación alcalina. Véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número 6,409,841.

20 **[0194]** En otros aspectos, un método de pretratamiento adecuado puede implicar la prehidrólisis de la biomasa (p. ej., materiales lignocelulósicos) en un reactor de prehidrólisis; la adición de un líquido ácido al material lignocelulósico sólido para hacer una mezcla; el calentamiento de la mezcla hasta alcanzar la temperatura de reacción; el mantenimiento de la temperatura de reacción durante un período de tiempo suficiente para fraccionar el material lignocelulósico en una parte solubilizada que contiene al menos aproximadamente un 20 % de la lignina del material lignocelulósico y una fracción sólida que contiene celulosa; la separación de la parte solubilizada de la fracción sólida, y la eliminación de la parte solubilizada mientras se encuentre a la temperatura de reacción o cerca de la misma; y la recuperación de la parte solubilizada. La celulosa en la fracción sólida se
25 hace más susceptible a la digestión enzimática. Véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos con número 5,705,369. En una variación de este aspecto, la prehidrólisis puede implicar, de forma alternativa o adicional, una prehidrólisis utilizando enzimas que son, por ejemplo, capaces de descomponer la lignina del material de biomasa lignocelulósica.

30 **[0195]** En otros aspectos, los pretratamientos adecuados pueden implicar el uso de peróxido de hidrógeno N_2O_2 . Véase Gould, 1984, *Biotech, and Bioengr.* 26:46-52.

35 **[0196]** En otros aspectos, un pretratamiento adecuado de los materiales de biomasa lignocelulósica, especialmente aquellos que comprenden cantidades mensurables de galactoglucomanos (GGM) y/o glucomanos (GM), puede incluir el método de pretratamiento alcalino KRAFT empleado, por ejemplo, por la Agencia Nacional de la Investigación de Francia. El método de pretratamiento KRAFT es un método muy conocido y ampliamente utilizado para convertir madera en pulpa de madera, que incluye de forma típica el tratamiento de astillas con una mezcla de hidróxido sódico y sulfuro de sodio, conocida en la industria como "licor blanco", que descompone los enlaces que unen la lignina a la celulosa. Es un método que se utiliza desde hace tiempo, principalmente en la industria del papel y la pulpa, inventado originalmente por Carl F. Dahl en 1879, como se describe en la patente de los Estados Unidos con número 296,935, concedida en 1884. También se
40 incluye el método de pretratamiento SPORL desarrollado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos específicamente para determinadas materias primas de biomasa de madera blanda, por ejemplo, para materiales de pino, píceas o álamo temblón, como se describe en Zhu *et al.*, (2009) *Bioresource Technol.* 100:2411-18. El método de pretratamiento SPORL implica la utilización de sulfito para tratar astillas de dichas maderas blandas en condiciones ácidas, seguido de una reducción mecánica del tamaño mediante refinado con
45 discos. Se informó de que el método SPORL produce unas cantidades reducidas de inhibidores de fermentación, como hidroximetilfurfural y/o furfural.

[0197] En otros aspectos, el pretratamiento también puede comprender el contacto de un material de biomasa con cantidades estequiométricas de hidróxido sódico e hidróxido amónico en una concentración muy baja. Véase Teixeira *et al.*, (1999), *Appl. Biochem. and Biotech.* 77-79:19-34.

50 **[0198]** En algunos modos de realización, el pretratamiento puede comprender el contacto de una lignocelulosa con un producto químico (p. ej., una base, como carbonato sódico o hidróxido de potasio) a un pH de aproximadamente 9 a aproximadamente 14 a una temperatura, una presión y un pH moderados. Véase la solicitud internacional publicada WO2004/081185. El amoníaco se utiliza, por ejemplo, en un método de pretratamiento preferido. Dicho método de pretratamiento comprende el sometimiento de un material de biomasa
55 a una baja concentración de amoníaco en condiciones de sólidos elevados. Véase, p. ej., la publicación de patente de los Estados Unidos con número 20070031918 y la solicitud internacional publicada WO 06110901.

A. El proceso de sacarificación

[0199] En algunos aspectos, en el presente documento se proporciona un proceso de sacarificación que comprende el tratamiento de un material de biomasa lignocelulósica, en concreto, uno que comprende una cantidad mensurable de galactoglucomananos (GGM) y/o glucomananos (GM), con una composición de enzimas que comprende un polipéptido, donde el polipéptido tiene actividad de beta-mananasa y donde el proceso tiene como resultado la conversión de al menos aproximadamente un 50 % en peso (p. ej., al menos aproximadamente un 55 % en peso, un 60 % en peso, un 65 % en peso, un 70 % en peso, un 75 % en peso, o un 80 % en peso) de la biomasa en azúcares fermentables. En algunos aspectos, la biomasa comprende lignina. En algunos aspectos, la biomasa comprende celulosa. En algunos aspectos, la biomasa comprende hemicelulosas. En algunos aspectos, la biomasa que comprende celulosa comprende además uno o más de manano, xilano, galactano y/o arabana. En determinados aspectos concretos, la biomasa comprende celulosa así como al menos un nivel mensurable de galactoglucomanano y/o glucomanano. En algunos aspectos, la biomasa puede ser, sin carácter limitativo, plantas de madera blanda (p. ej., píceas, pinos, álamos temblones), semillas, cereales, tubérculos, residuos vegetales (p. ej., racimos de fruta vacíos de palmeras, o residuos de fibras de palmeras) o productos secundarios resultantes de transformación alimentaria o procesos industriales (p. ej., tallos), maíz (incluyendo, p. ej., zuros, rastrojos, y similares), plantas herbáceas (incluyendo, p. ej., *Indian grass*, como *Sorghastrum nutans*; o *switchgrass*, p. ej., especies de *Panicum*, como *Panicum virgatum*), cañas perennes (p. ej., cañas comunes), materiales leñosos (incluyendo, p. ej., astillas, procesado de residuos), papel, pulpa, y papel reciclado (incluyendo, p. ej., periódicos, papel para impresora, y similares), patata, soja (p. ej., colza), cebada, centeno, avena, trigo, remolachas, y bagazo de caña de azúcar.

[0200] En algunos aspectos, el material que comprende biomasa se somete a uno/a o más métodos/fases de pretratamiento antes de ser tratado con el polipéptido Pkr Man3 o la composición que comprende el polipéptido Pkr Man3. En algunos aspectos, la sacarificación o hidrólisis enzimática comprende además el tratamiento de la biomasa con una composición de enzimas que comprende un polipéptido Pkr Man3 de la invención. La composición de enzimas puede comprender, por ejemplo, una o más celulasas, por ejemplo, una o más endoglucanasas, una o más celobiohidrolasas, y/o una o más beta-glucosidasas, además del polipéptido Pkr Man3. De forma alternativa, la composición de enzimas puede comprender una o más otras hemicelulasas, por ejemplo, una o más otras beta-mananasas, una o más xilanasas, una o más beta-xilosidasas, y/o una o más L-arabinofuranosidasas. En determinados modos de realización, la composición de enzimas comprende un polipéptido Pkr Man3 de la invención, una o más celulasas, una o más otras hemicelulasas. En algunos modos de realización, la composición de enzimas es una composición de caldo de fermentación, sometida de forma opcional a algún procesamiento de fermentación/producción posterior. En determinados modos de realización, la composición de enzimas es una formulación de caldo entero.

[0201] En algunos aspectos, se proporciona un proceso de sacarificación que comprende el tratamiento de un material de biomasa lignocelulósica con una composición que comprende un polipéptido, donde el polipéptido tiene al menos aproximadamente un 55 % (p. ej., al menos aproximadamente un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO:2, o con la secuencia madura de SEQ ID NO:3, y donde el proceso tiene como resultado la conversión de al menos aproximadamente un 50 % (p. ej., al menos aproximadamente un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, o un 90 %) en peso de la biomasa en azúcares fermentables. En algunos aspectos, el material de biomasa lignocelulósica se ha sometido a uno/a o más métodos/fases de pretratamiento como se describe en el presente documento.

[0202] A partir de la anterior descripción y de los ejemplos que se exponen a continuación, surgirán otros aspectos y modos de realización de las presentes composiciones y métodos.

45 EJEMPLOS

[0203] Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de proporcionar a los expertos en la materia una exposición y una descripción completas de cómo elaborar y utilizar las presentes composiciones y métodos, y no tienen por objetivo limitar el alcance de lo que los inventores consideran sus composiciones y métodos inventivos, ni representar que los experimentos que se presentan más abajo son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión en lo que respecta a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero debería darse cuenta de algunos errores o desviaciones experimentales.

EJEMPLO 1**Clonación de Pkr Man3 de glucósido hidrolasa de *Paenibacillus kribbensis***

[0204] Se seleccionó *Paenibacillus kribbensis* como una fuente potencial de varias glucósido hidrolasas y otras enzimas útiles para aplicaciones industriales. El ADN genómico para secuenciación se obtuvo cultivando en primer lugar una cepa de *Paenibacillus kribbensis* en placas de agar lb a 30 °C durante aproximadamente 24 horas. El material celular se raspó de las placas y se utilizó para preparar ADN genómico mediante extracción con fenol/cloroformo. El ADN genómico se utilizó para secuenciar y para amplificar el gen *pk_r man3* para su posterior clonación por expresión.

[0205] El genoma completo de *Paenibacillus kribbensis* se secuenció utilizando la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS, por sus siglas en inglés) de Illumina®, lo que fue llevado a cabo por BaseClear (Leiden, Países Bajos) (www.baseclear.com/sequencing/illumina-sequencing), mientras que los cóntigos fueron anotados por BioXpr (Namur, Bélgica). Utilizando BLASTP, se descubrió que uno de los genes de la secuencia genómica de *Paenibacillus kribbensis* es una glucósido hidrolasa y tiene homología con otras mananasas bacterianas. La secuencia de ácido nucleico de este gen se designó como gen *pk_r man3*, con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1. El gen tiene un codón de inicio alternativo (GTG). La secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por el gen *pk_r man3* se designó como polipéptido Pkr Man3, con la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO:2. Se previó que el polipéptido tuviera un péptido señal de 34 residuos de aminoácidos de longitud, utilizando el sistema SignalP-NN del programa Signal P 3.0 (www.cbs.dtu/services/SignalP) (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols, 2: 953-971, 2007). La presencia de una secuencia señal sugiere que el polipéptido Pkr Man3 es una glucósido hidrolasa secretada.

EJEMPLO 2**Expresión de Pkr Man3 de beta-mananasa de *Paenibacillus kribbensis* en un huésped de *Bacillus subtilis***

[0206] El gen *pk_r man3* se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico de *Paenibacillus kribbensis* utilizando los siguientes cebadores:

Cebador directo: 5'- TGAGCGCGCA GGCAGCTGGT AAAGCCTCCG GTTTTATGT AAGC -3' (SEQ ID NO:6)

Cebador inverso: 5'- CGCCTCGAGT TAGTAAACCG AAGCTTCTT CGAA -3' (SEQ ID NO:7)

[0207] El cebador directo contenía parte de la secuencia señal *aprE* (SEQ ID NO: 12 en el presente documento) y la secuencia de inicio del gen *pk_r man3* maduro. El cebador inverso contenía el final de la secuencia del gen *pk_r man3*, el codón de terminación y un sitio de restricción *Xho I*, así como 3 codones protectores extra. Tras la amplificación por PCR, se clonó el gen *pk_r man3* amplificado en plásmido de expresión p2JM mediante doble digestión y ligamiento de *BssHIII/XhoI*, lo que implicó la utilización de enzimas de restricción *BssHIII* y *XhoI* para digerir el vector de expresión p2JM103BBI de *Bacillus subtilis* (Vogtentanz, Protein Expr Purif, 55:40-52, 2007). El ligamiento del fragmento de ADN resultante al gen amplificado por PCR que codifica el polipéptido maduro Pkr Man3 (SEQ ID NO:3) dio lugar a codones que codifican 3 residuos adicionales, Ala-Gly-Lys, insertados entre el extremo 3' del propéptido AprE de *Bacillus subtilis* y el extremo 5' del gen *Pkr Man3*. El plásmido resultante se marcó como pZQ191 (*aprE*-Pkr Man3, **FIGURA 1**). Tras la escisión de la peptidasa señal natural en el huésped, se previó que el polipéptido Pkr Man3 recombinante producido de esta forma tuviera 3 aminoácidos adicionales, Ala-Gly-Lys, en su amino-terminal, y así fue.

[0208] La secuencia del gen *pk_r man3* se confirmó mediante secuenciación de ADN (SEQ ID NO: 8). La secuencia de aminoácidos del polipéptido Pkr Man3 de longitud completa expresado a partir del plásmido pZQ191 se confirmó y se presentó como SEQ ID NO:9, con la secuencia señal mostrada en cursiva y la adición de los tres residuos mostrada en negrita. La secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro Pkr Man3 expresado a partir del plásmido pZQ191 se confirmó y se presentó como SEQ ID NO:10, con la extensión amino-terminal de tres residuos basada en el sitio de escisión previsto mostrado en negrita. Después de la escisión de los tres residuos de la extensión terminal, se confirmó que el polipéptido Pkr Man3 maduro tenía la secuencia de SEQ ID NO: 11.

[0209] El polipéptido Pkr Man3 producido en las células huésped de *Bacillus subtilis*, como se ha descrito anteriormente, se secretó al medio de cultivo extracelular después de que se completase la expresión. Por consiguiente, se filtró y se concentró el medio de cultivo de expresión, y se utilizó para la purificación de proteínas.

EJEMPLO 3**Purificación de Pkr Man3 de beta-mananasa de un medio de cultivo de *Bacillus subtilis***

[0210] La purificación de Pkr Man3 a partir del sobrenadante del medio de cultivo concentrado y filtrado tuvo lugar utilizando 3 columnas de cromatografía distintas: (1) una columna de Sepharose de intercambio aniónico (Sepharose-Q FF, XK 26/10), equilibrada con un tampón de 20 mM de Tris, pH 7.5, de la que se eluyó el polipéptido utilizando un gradiente lineal del tampón de equilibrado y un tampón de lavado de 20 mM de Tris, pH 7.5, 1 M de NaCl; (2) una columna de Sepharose de intercambio aniónico (Sepharose-Q FF, XK 26/10), equilibrada con un tampón de 25 mM de carbonato sódico, pH 10.0, de la que se eluyó el polipéptido utilizando un gradiente lineal del tampón de equilibrado y un tampón de lavado de 25 mM de carbonato sódico, pH 10.0, 1 M de NaCl; y (3) una columna de filtración por gel HiLoad Superdex 75 pg 26/60, de la que se eluyó la proteína utilizando un tampón de elución de 20 mM de fosfato de sodio, pH 7.0, 0,15 M de NaCl.

[0211] La pureza del polipéptido se determinó utilizando SDS-PAGE, y el peso molecular previsto del polipéptido Pkr Man3, que tiene 303 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 33 kDa, se utilizó para confirmar la identidad del polipéptido Pkr Man3. El polipéptido Pkr Man3 purificado se utilizó para llevar a cabo los estudios sobre el perfil de pH, el perfil de temperatura y el perfil de termoestabilidad que se presentan a continuación.

EJEMPLO 4**Expresión de Pkr Man3 de beta-mananasa de *Paenibacillus kribbensis* en un huésped de *T. reesei***

[0212] El gen *pkrm3* puede amplificarse a partir de ADN genómico de *Paenibacillus kribbensis* mediante PCR, con la secuencia señal nativa y una secuencia CACC añadida al extremo 5' del cebador directo para clonación Gateway direccional (Invitrogen, Carlsbad, CA). De forma alternativa, puede emplearse una secuencia señal de *T. reesei cbhl*, sustituyendo la secuencia señal nativa. El producto de la PCR del gen *pkrm3* puede purificarse utilizando un kit de purificación llamado Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen). Entonces, el producto de la PCR purificado puede clonarse en el vector pENTR/D-TOPO, transformarse en células de *E. coli* químicamente competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen), y depositarse entonces en placas LA que contienen 50 ppm de kanamicina. Entonces, puede obtenerse ADN plasmídico a partir de los transformantes de *E. coli*, mediante un kit de preparación de plásmidos QIAspin (Qiagen).

[0213] Entonces, la secuencia nucleotídica del ADN insertado puede confirmarse como SEQ ID NO:1 utilizando métodos de secuenciación bien conocidos. El vector pENTR/D-TOPO_*PkrMan3* que incluye el gen *pkrm3* puede entonces recombinarse con el vector de expresión pTrex3gM (véase, p. ej., la solicitud de patente internacional publicada WO 05/001036, FIGURA 2), mediante una reacción con LR clonase® (véase los protocolos de Invitrogen).

[0214] Entonces, el producto de la reacción con LR clonase® (esto es, el vector pTrex3gM_*PkrMan3*) puede transformarse en células de *E. coli* químicamente competentes One Shot® TOP10 (Invitrogen) y depositarse en el medio LA que contiene 50 ppm de carbenicilina. El vector pTrex3gM también contiene el gen *Aspergillus tubingensis amdS*, que codifica acetamidasa, como un marcador selectivo para la transformación de *T. reesei*. El vector pTrex3gM también contiene un promotor y un terminador *cbhl*, que flanquean la secuencia del *pkrm3*.

[0215] A partir de entonces, puede utilizarse aproximadamente de 0,5 a 1 µg del vector de expresión pTrex3gM_*PkrMan3* (o un fragmento amplificado por PCR) para transformar una cepa de *T. reesei* con sus genes de celulasa principales delecionados, por ejemplo, una cepa con seis deleciones como la descrita, p. ej., en la publicación de solicitud de patente internacional con número WO 2010/141779), mediante el método de protoplastos con PEG con modificaciones como se describe en el presente documento.

[0216] Para la preparación de protoplastos, pueden cultivarse esporas durante 16-24 horas a 24 °C en un medio mínimo MM de *Trichoderma*, que contiene 20 g/L de glucosa, 15 g/L de KH₂PO₄, pH 4,5, 5 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,6 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0,6 g/L de CaCl₂·2H₂O, 1 mL de 1000 X solución de oligoelementos de *T. reesei* (5 g/L de FeSO₄·7H₂O, 1,4 g/L de ZnSO₄·7H₂O, 1,6 g/L de MnSO₄·xH₂O, 3,7 g/L de CoCl₂·x6H₂O) con agitación a 150 rpm. Entonces, las esporas germinantes pueden cosecharse mediante centrifugación y tratarse con 50 mg/mL de solución Glucanex G200 (Novozymes AG) para lisar las paredes de las células fúngicas. Puede llevarse a cabo una preparación adicional de los protoplastos según un método descrito por Penttilä *et al.* Gene 61(1987)155-164. La mezcla de transformación, que contiene aproximadamente 1 µg de ADN y al menos 1 x 10⁷ protoplastos en un volumen total de 200 µL, puede tratarse entonces con 2 mL de 25 % solución PEG, diluida con 2 volúmenes de 1,2 M de sorbitol/10 mM de Tris, pH 7.5, 10 mM de CaCl₂, mezclados con 3 % MM de agarosa superior selectiva que contiene 20 mM de acetamida. Entonces, la mezcla resultante se vierte en una placa de 2

% de agarosa selectiva que contiene acetamida. Posteriormente, las placas se incuban durante 7-10 d a 28 °C. Entonces, se transfieren transformantes individuales a placas MM nuevas que contienen acetamida. Entonces, se utilizan esporas de clones independientes para inocular un medio de fermentación en placas de microtitulación de 96 pocillos o en matraces de agitación.

- 5 [0217] La proteína secretada de los caldos de cultivo puede purificarse, someterse de forma opcional a algún procesamiento posterior a la fermentación, o puede utilizarse directamente para la sacarificación o la hidrólisis de sustratos de biomasa lignocelulósica que contienen manano.

EJEMPLO 5

La actividad de beta-mananasa de Pkr Man3

- 10 [0218] La actividad de beta-1,4 mananasa de Pkr Man3 se midió utilizando un 1 % de galactomanano (algarrobo; viscosidad baja) (P-GALML; Lote 10501) adquirido de Megazyme International Ireland (Bray, Irlanda) como sustrato. El ensayo se llevó a cabo en un tampón de 50 mM de acetato sódico, pH 5.0, que contiene 0,005 % de Tween-80, en el que se incubaron el polipéptido y el sustrato a 50 °C durante 10 minutos. De forma alternativa, el ensayo se llevó a cabo en un tampón de 50 mM de HEPES, pH 8.2, que contiene 0,005 % de Tween-80, en el que se incubaron el polipéptido y el sustrato a 30 °C durante 30 minutos.

- 15 [0219] El/los azúcar(es) reductor(es) liberado(s) por la reacción de hidrólisis se cuantificó/cuantificaron utilizando un ensayo PAHBAH (ácido p-hidroxibenzoico hidrazida) como se describe en Lever (1972) Anal. Biochem. S47:248. Se preparó una curva estándar utilizando varias cantidades de manosa como estándares, y se calcularon las unidades de actividad enzimática específicas. De forma específica, se definió una unidad de mananasa como la cantidad de enzima requerida para generar 1 micromol de manosa que reduce equivalentes de azúcar por minuto en un conjunto de condiciones determinadas.

[0220] Según la medición, la actividad específica del polipéptido Pkr Man3 purificado era de aproximadamente 86 unidades/mg a pH 5.0, y aproximadamente 46 unidades/mg a pH 8.2.

EJEMPLO 6

- 25 El perfil de pH de Pkr Man3

- [0221] El perfil de pH de Pkr Man3 se determinó utilizando goma garrofín de semillas de *Ceratonía siliqua* (Sigma G0753) como sustrato. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en un tampón de citrato de sodio/fosfato de sodio, que tenía varios valores de pH en un rango entre pH 2 y pH 9. Se añadieron veinticinco (25) µL de un tampón de 0,5 M de citrato de sodio/fosfato de sodio a 65 µL de goma garrofín (1 % de solución acuosa) en una placa de 96 pocillos, y el sustrato se equilibró a la temperatura de ensayo de 50 °C antes de la adición de la enzima. Después de continuar durante 10 minutos, la reacción enzimática se detuvo mediante la transferencia de 10 µL de la mezcla de reacción a un pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos, que contenía 100 µL de solución PAHBAH. Entonces, se incubó la placa de PCR a 95 °C durante 5 minutos en un DNA Engine de Bio-Rad. La placa de PCR se enfrió posteriormente en hielo y se transfirieron 100 µL de la mezcla del pocillo a una nueva placa de ensayo de 96 pocillos.

[0222] La cantidad de azúcar(es) reductor(es) liberado(s) del sustrato se determinó como 410 nm midiendo la densidad óptica de la mezcla de reacción con un espectrofotómetro tras completarse la reacción como se ha descrito anteriormente. La actividad enzimática a cada pH se indicó como actividad relativa donde la actividad al pH óptimo se normalizó al 100 %.

- 40 [0223] El perfil de pH de Pkr Man3 se muestra en la **FIGURA 3**. Se descubrió que el Pkr Man3 tiene un pH óptimo a aproximadamente pH 5.0. También se descubrió que el polipéptido retenía más de un 70 % de su actividad máxima entre pH 2.8 y pH 7.6.

EJEMPLO 7

El perfil de temperatura de Pkr Man3

- 45 [0224] La temperatura óptima del polipéptido Pkr Man3 purificado se determinó midiendo la beta-mananasa de Pkr Man3, a varias temperaturas entre 40 °C y 84 °C, en un tampón de 50 mM de citrato de sodio, a pH 6.0, durante 10 minutos. La actividad se indicó como actividad relativa donde la actividad a la temperatura óptima se normalizó al 100 %. El perfil de temperatura de Pkr Man3 se muestra en la **FIGURA 4**.

[0225] Se descubrió que el Pkr Man3 tiene una temperatura óptima de aproximadamente 64 °C. También se descubrió que el Pkr Man3 retiene más de un 80 % de su actividad máxima entre las temperaturas de 40 °C and 68 °C.

EJEMPLO 8

5 El perfil de termoestabilidad de Pkr Man3

[0226] La termoestabilidad de Pkr Man3 se determinó en un tampón de 50 mM de citrato de sodio, pH 6.0. La enzima se incubó en un termociclador de PCR a la temperatura deseada durante 2 horas. La actividad restante o residual de cada muestra se midió como se describe en el Ejemplo 5 expuesto con anterioridad. La actividad de una muestra de Pkr Man3 de control mantenida en hielo se utilizó para definir una actividad retenida al 100 %. El perfil de termoestabilidad de Pkr Man3 se muestra en la **FIGURA 5**.

[0227] El Pkr Man3 retuvo aproximadamente un 50 % de actividad tras un período de incubación de 2 horas a 82 °C. No se detectó ninguna pérdida de actividad tras un período de incubación de 2 horas a temperaturas inferiores a 60 °C, lo que indica que el Pkr Man3 era extraordinariamente termoestable.

EJEMPLO 9

15 Hidrólisis de un sustrato de biomasa de madera blanda pretratado con KRAFT alcalino utilizando una composición de enzimas que comprende Pkr Man3.

[0228] Se obtuvo un sustrato de madera blanda pretratado con KRAFT alcalino FPP-27 de la Agencia Nacional de la Investigación de Francia (ARN-05-BIOE-007) a través de un proyecto de investigación financiado por la Agencia Nacional del Medio Ambiente y del Control de la Energía de Francia (ADEME 0501 C0099), y se realizó un análisis de la composición, que indicó el siguiente contenido de la biomasa: ~2,5 % en peso de lignina Klason; ~81,4 % en peso de glucano; ~ 7,9 % en peso de xilano, ~0,8 % en peso de galactano; y ~6,5 % en peso de manano. El sustrato, en una cantidad de 1,93 g, a un nivel de carga de sólidos secos de 8,6 % y una carga de celulosa total de 7 %, se mezcló con una muestra de Accellerase® TRIO™ (que se diluyó previamente en la concentración deseada, según fue necesario, utilizando un tampón de 0,05 M de citrato de sodio, a pH 5.0) a 10 mg/g de glucano en una mezcla de reacción como control. El sustrato, en una cantidad de 1,93 g, al mismo nivel de carga de sólidos secos de 8,6 % y una carga de celulosa total de 7 %, se mezcló con una enzima mixta que contenía 9 mg/g de glucano de Accellerase® TRIO™ y 1 mg/g de glucano de Pkr Man3, o 1 mg/g de glucano de BamGh8, o 1 mg/g de Gte Man1 en una mezcla de reacción. Las mezclas de reacción y la mezcla de control se ajustaron a pH 5 utilizando un tampón de 0,1 M de citrato de sodio. Se añadió un 5 % de azida de sodio a cada mezcla de reacción y mezcla de control para controlar el crecimiento microbiano.

[0229] Entonces, la mezcla de reacción y la mezcla de control se incuban en un incubador agitador New Brunswick Scientific Innova 44 a 50 °C, con una agitación suave a 200 rpm. Tras 24 horas, 48 horas, 72 horas, se tomó una pequeña muestra de aproximadamente 200 µL de cada mezcla de reacción, diluida en 200 µL de agua MilliQ, seguido de una filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Entonces, se inyectó el filtrado en una HPLC (siglas en inglés para cromatografía líquida de alta resolución) Waters, equipada con un módulo de separación Waters 2695 Separation Module, ajustado a un flujo de 0,6 mL/min, y una fase móvil de agua MilliQ desgasada con un filtro de 0,2 µm; una columna Phenomenex Rezex RCM 300 x 7,8 mm, y en tándem, una columna RPM 300 x 7,8 mm; un kit Phenomenex SecurityGuard, que incluye un cartucho de seguridad Carbo-Ca 4 x 3,0 mm; y un detector de índice de refracción Waters 2414 Refractive Index Detector, ajustado a una temperatura operativa de 50 °C. Se analizó la cantidad de glucosa, xilosa y manosa tanto de las mezclas de reacción como de la mezcla de control. Los resultados se presentan en las **FIGURAS 6A-6C**.

[0230] Se dejó continuar a las mezclas de reacción durante 168 horas, y la conversión de carbohidratos total de cada una de las muestras durante el período de tiempo que va de las 24 a las 168 horas se trazó y se representó en forma de evoluciones temporales en la **FIGURA 7**.

45 EJEMPLO 10

Reducción de la viscosidad mediante Pkr Man3

[0231] Puede utilizarse una pulpa de madera blanda pretratada con KRAFT FPP-27, que contenga lo siguiente según un análisis de su composición: ~2,5 % en peso de lignina Klason; ~81,4 % en peso de glucano; ~ 7,9 % en peso de xilano; ~0,8 % en peso de galactano; y ~6,5 % en peso de manano. De forma alternativa, puede utilizarse el mismo sustrato de madera blanda pretratado con SPORL, que contenga lo siguiente según un análisis de su composición: ~32,4 % en peso de lignina Klason; ~49,4 % en peso de glucano; ~ 3,4 % en peso de

xilano; y ~4,6 % en peso de manano. Como sustrato de control, puede utilizarse un rastrojo de maíz hidrolizado entero pretratado con ácido (whPCS) (véase, p. ej., www.nrel.gov/docs/fy11osti/47764.pdf), que no contenga GGM o GM, pero contenga ~ 33,8 % en peso de glucano, nada de xilano, y ~ 2,2 % de galactano.

5 **[0232]** Entonces, una cantidad de 1,93 g de dicho sustrato (incluyendo, por ejemplo, el sustrato FPP-27 o el sustrato de madera blanda pretratado con SPORL, y el sustrato de control whPCS), a un nivel de carga de sólidos secos de 8,6 % y una carga de glucano total de 7,0 %, puede mezclarse con 10 mg/g de glucano de Accellerase® TRIO™ como mezcla de control, y con 1 mg/g de glucano de Pkr Man3 más 9 mg/g de glucano de Accellerase® TRIO™ en una mezcla de reacción. Entonces, la mezcla de reacción y la mezcla de control se
10 ajustan a pH 5.0 utilizando un tampón de 0,1 M de citrato de sodio, y la incubación puede tener lugar con una agitación suave a una temperatura de aproximadamente 50 °C, durante al menos 16 horas.

[0233] Después de al menos 16 horas de incubación, puede determinarse la viscosidad de cada mezcla resultante (aproximadamente 2-3 gramos de muestra) utilizando el viscosímetro Rapid Visco Analyzer Super 4 Viscometer (Newport Scientific). Cuando el polipéptido Pkr Man3 se mezcla con Accellerase® TRIO™ en las
15 proporciones arriba descritas, este otorga un beneficio sustancial de reducción de la viscosidad como, por ejemplo, alcanzar al menos un 20 % de viscosidad reducida en el punto de incubación de las 16 horas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de enzimas que comprende un polipéptido recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 55 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, donde el polipéptido tiene actividad de beta-mananasa, y una o más celulasas, o una o más otras hemicelulasas.

5
2. La composición de enzimas de la reivindicación 1, donde el polipéptido recombinante mejora el rendimiento de hidrólisis de una composición de celulasa cuando el polipéptido recombinante constituye hasta un 20 % en peso de la composición de celulasa, donde el rendimiento de hidrólisis mejorado comprende:
 - (a) un % de conversión de glucano incrementado, un % de conversión de xilano incrementado, y/o un % de conversión de glucano y de xilano incrementado a partir de un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado en las mismas condiciones de hidrólisis; o
 - (b) una reducción de la viscosidad al menos aproximadamente un 5 % más rápida de un sustrato de biomasa lignocelulósica determinado en las mismas condiciones de hidrólisis.

10
3. La composición de enzimas de la reivindicación 1 o 2, donde el polipéptido tiene una actividad de beta-mananasa incrementada en comparación con la actividad de beta-mananasa de:
 - (i) BamGh8 que comprende SEQ ID NO:4; o
 - (ii) Gte Man1 que comprende SEQ ID NO:5.

15
4. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido recombinante retiene más del 70 % de su actividad de beta-mananasa máxima cuando se incuba en un rango de pH que va de pH 2.8 a pH 7.6.

20
5. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el polipéptido recombinante tiene una actividad de beta-mananasa óptima a un pH de aproximadamente 5.0.
6. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el polipéptido recombinante retiene al menos un 80 % o más de su actividad de beta-mananasa máxima cuando se incuba a una temperatura entre 40 °C y 68 °C.

25
7. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el polipéptido tiene una actividad de beta-mananasa óptima a una temperatura de aproximadamente 64 °C o mayor.
8. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el polipéptido recombinante retiene al menos un 50 % de su actividad de beta-mananasa máxima cuando se incuba durante aproximadamente 2 horas a una temperatura de aproximadamente 82 °C.

30
9. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el polipéptido recombinante retiene al menos un 99 % de su actividad de beta-mananasa máxima cuando se incuba durante aproximadamente 2 horas a una temperatura de hasta 60 °C.
10. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el polipéptido recombinante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

35
11. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la una o más celulasas son seleccionadas de una o más beta-glucosidasas, una o más celobiohidrolasas, y una o más endoglucanasas.

40
12. La composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la una o más otras hemicelulasas son seleccionadas de una o más otras beta-mananasas, una o más una o más xilanasas, una o más beta-xilosidasas, y una o más L-arabinofuranosidasas.
13. Un método para hidrolizar un sustrato de biomasa lignocelulósica, que comprende: el contacto del sustrato de biomasa lignocelulósica con la composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para producir glucosa y otros azúcares.

45

14. Una composición que comprende la composición de enzimas de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un sustrato de biomasa lignocelulósica.
15. El método de la reivindicación 13 o la composición de la reivindicación 14, donde el sustrato de biomasa lignocelulósica comprende hasta aproximadamente un 20 % en peso, o hasta aproximadamente un 15 % en peso, o hasta aproximadamente un 10 % en peso de galactoglucomanano y/o glucomanano.
- 5

FIGURA 1: Mapa de pZQ191 (aprE-PkrMan3)

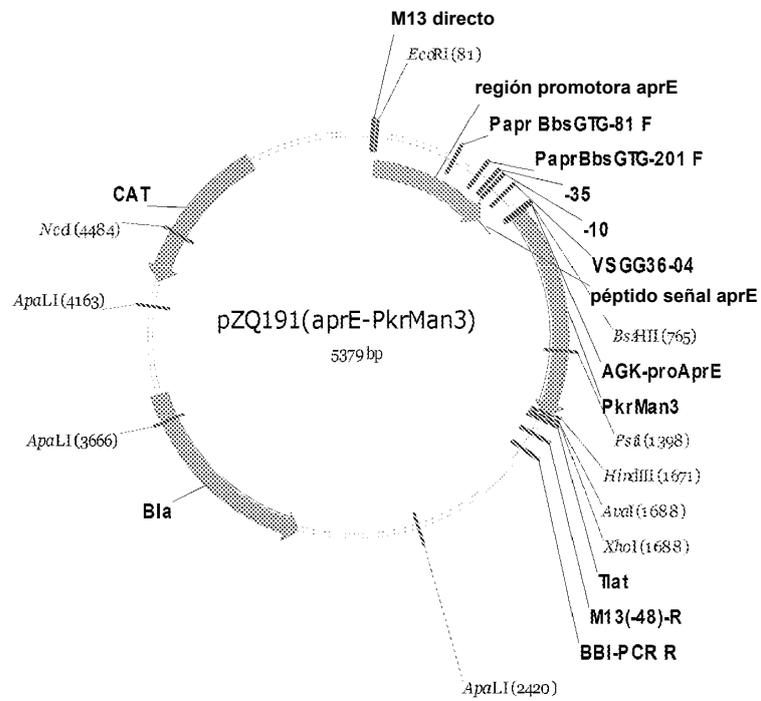


FIGURA 2: Mapa del constructo pTrex3gM

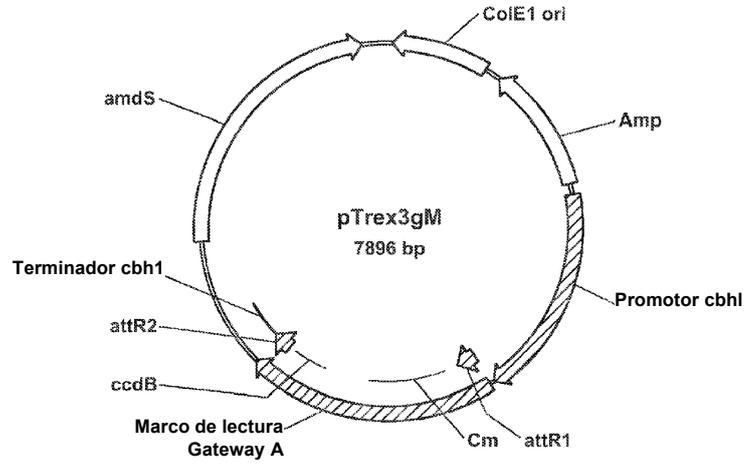


FIGURA 3: Perfil de pH de Pkr Man3.

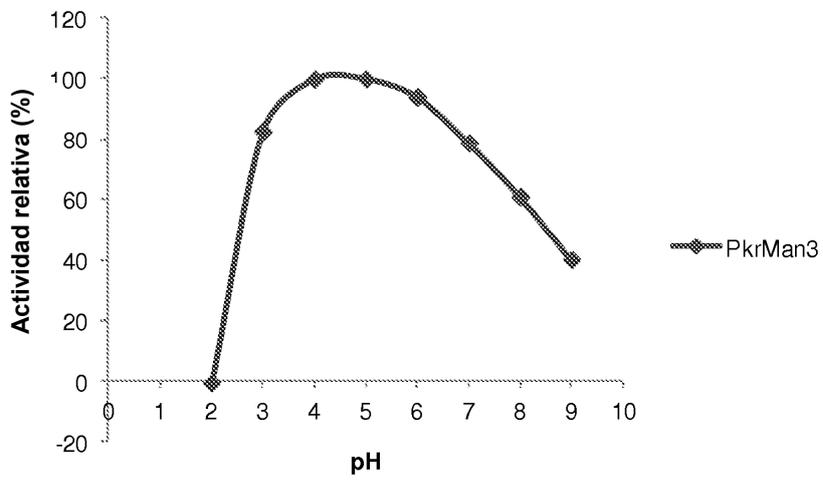


FIGURA 4: Perfil de temperatura de Pkr Man3.

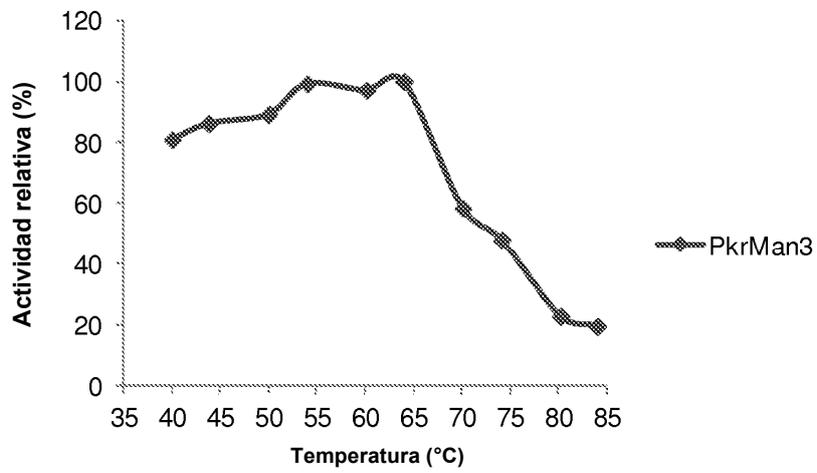


FIGURA 5: Perfil de termoestabilidad de Pkr Man3.

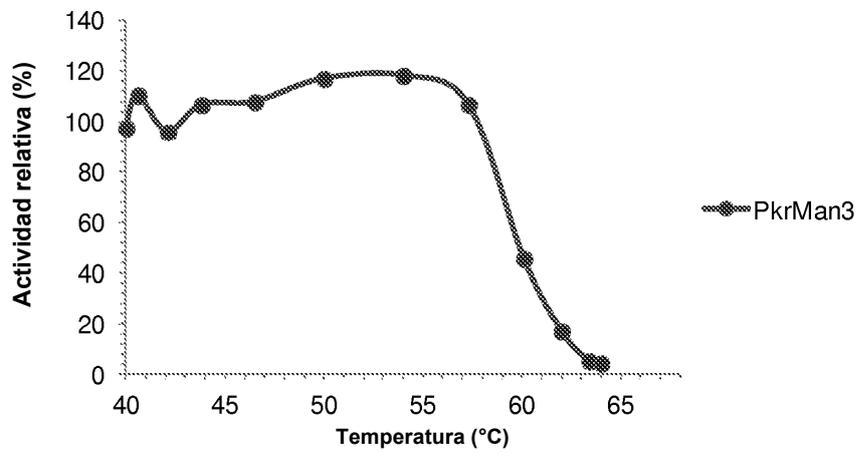


FIGURA 6A

Comparación de los resultados de la hidrólisis de un sustrato de madera blanda pretratado con KRAFT FPP-27 tras 24 horas, obtenidos mediante Accellerase® TRIO™, una mezcla de 9 partes de Accellerase® TRIO™ y una parte de beta-mananasa (donde las beta-mananasas son Pkr Man3, la beta-mananasa de *Bacillus hemicellulosilyticus* (Bam Gh8, SEQ ID NO:4), y la beta-mananasa de *Geobacillus tepidamans* (Gte Man 1, SEQ ID NO:5))

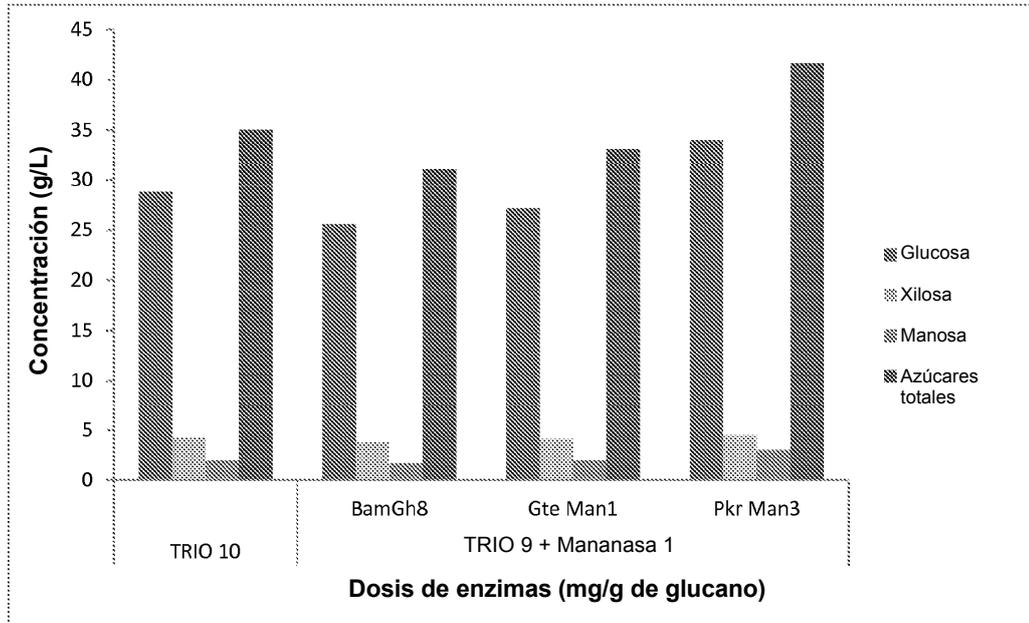


FIGURA 6B

Comparación de los resultados de la hidrólisis de un sustrato de madera blanda pretratado con KRAFT FPP-27 tras 48 horas, obtenidos mediante Accellerase® TRIO™, una mezcla de 9 partes de Accellerase® TRIO™ y una parte de beta-mananasa (donde las beta-mananasas son Pkr Man3, la beta-mananasa de *Bacillus hemicellulosilyticus* (Bam Gh8, SEQ ID NO:4), y la beta-mananasa de *Geobacillus tepidamans* (Gte Man 1, SEQ ID NO:5))

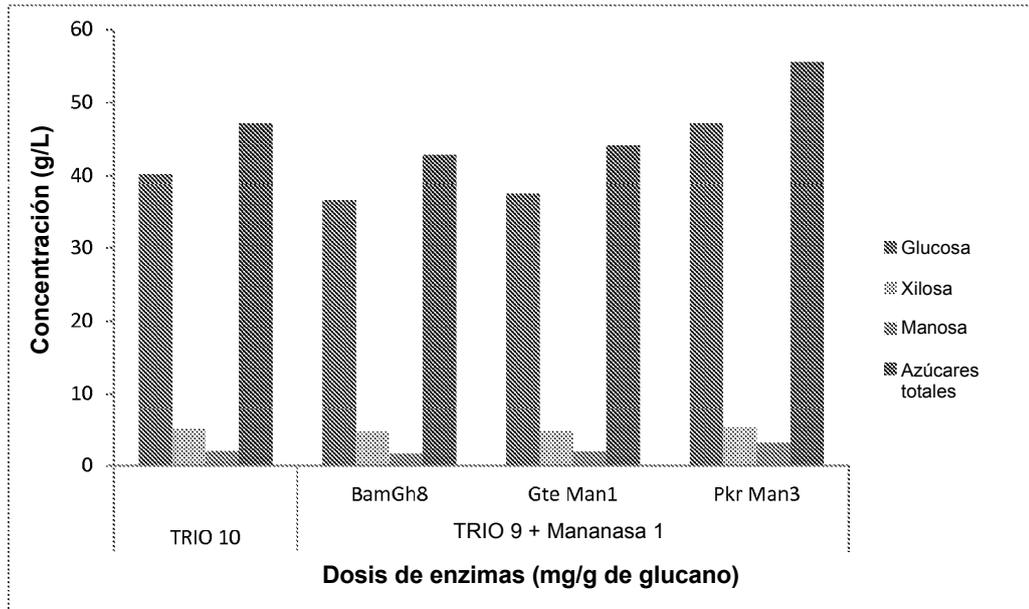


FIGURA 6C

Comparación de los resultados de la hidrólisis de un sustrato de madera blanda pretratado con KRAFT FPP-27 tras 72 horas, obtenidos mediante Accellerase® TRIO™, una mezcla de 9 partes de Accellerase® TRIO™ y una parte de beta-mananasa (donde las beta-mananasas son Pkr Man3, la beta-mananasa de *Bacillus hemicellulosilyticus* (Bam Gh8, SEQ ID NO:4), y la beta-mananasa de *Geobacillus tepidamans* (Gte Man 1, SEQ ID NO:5))

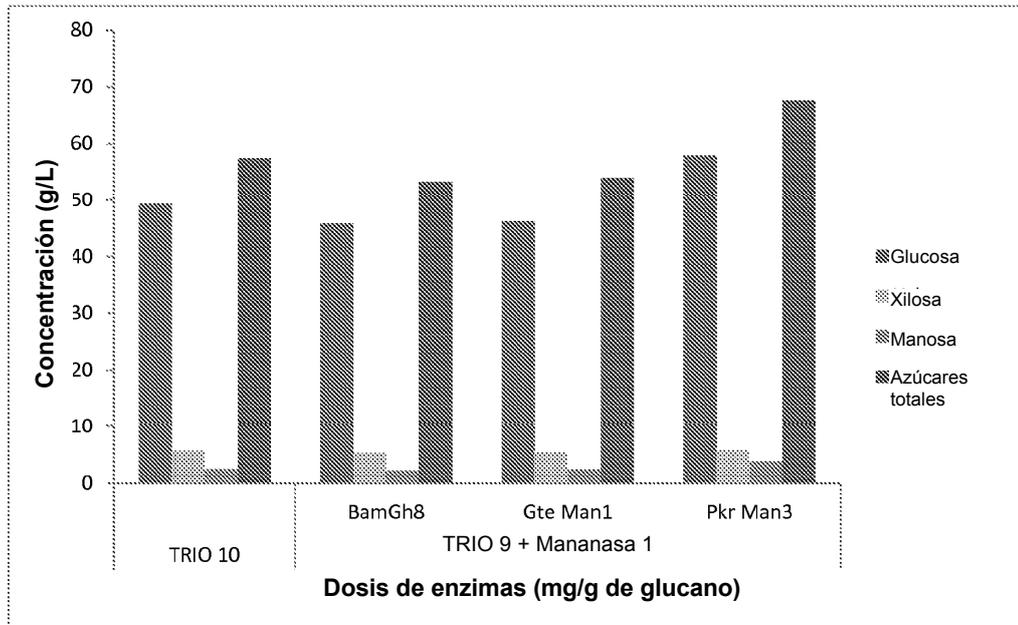


FIGURA 7

Comparación de los resultados de la hidrólisis total del sustrato de madera blanda pretratado con KRAFT FPP-27 mediante Accellerase® TRIO™, contra una mezcla de 9 partes de Accellerase® TRIO™ con una parte (esto es, un 10 % en peso) de un polipéptido Pkr Man3, una beta-mananasa de *Bacillus hemicellulosilyticus* de SEQ ID NO:4 ("Bam Gh8"), o una beta-mananasa de *Geobacillus tepidamans* de SEQ ID NO:5 ("Gte Man 1"), tras un periodo de tiempo de 24 horas a 168 horas.

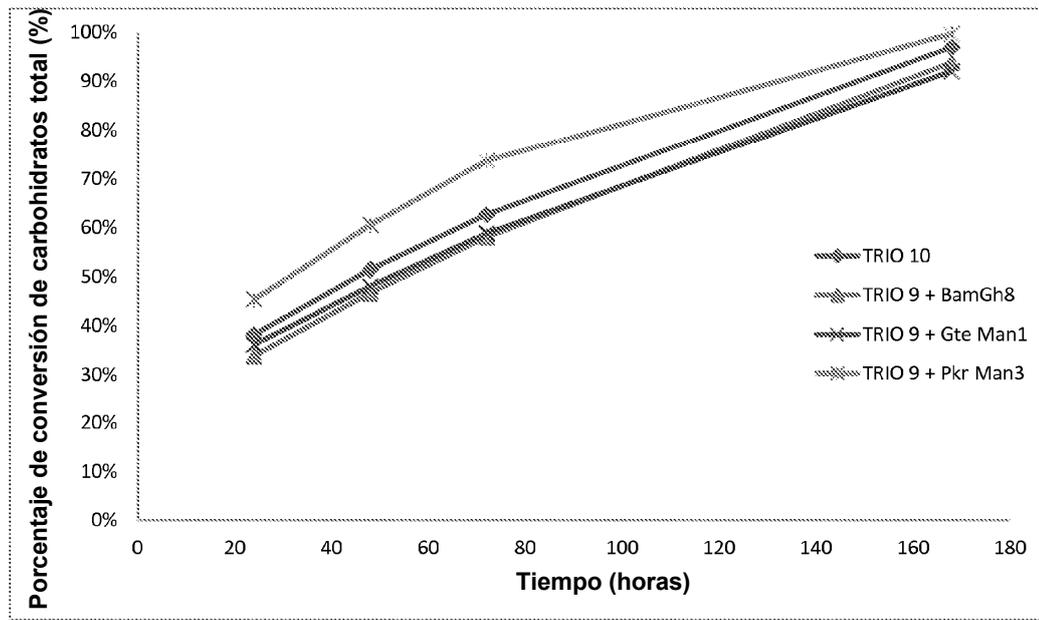


FIGURA 8A

SEQ ID NO:1 – Secuencia polinucleotídica que codifica Pkr Man3 de *Paenibacillus kribbensis*.

GTGAGAGATTGGCGTCTTTATGGCAAAAAGGCTTTCATCTTTACTATTATTTTTCTGCTTT
 GTTCCAGTGTAGGGTTATTGAATGCAGGTACATCATTGCAGCCTCCGGTTTTTATGTAA
 GCGGAAACAATTTGAAGGATGCCAATGGGAACAACTTTGTGATGCGCGGGGTGAACAAC
 CCTCATATCTGGTTTGACGCACAAGCCTATCAGGCATTGGATGCGATTGCTGCGACGAAG
 TCCAACACCGTCCGCATTGTGTGGCAAACCAATGGATCGGCGCAAAGACTCGGAGAGAT
 CATCGAACGGGCCAAACAGCTCAAGCTGATTTCCGTGGTTGAGCTGCACGACGTGACTG
 GCAGCAATGATGCCAACCGTTTGAACGACATGGCCCGTTATTTGCTGACCCAGCGGTGA
 AAAAAATACTGGCCGATAATCAGAAGTACGTCCTCGTGAATATCGCCAATGAATGGGGC
 GACCACAACCTCTCGGATGCCGCATGGCGGGACGTTACAAAACCTGCAATTACCACCCT
 GCGAAACGCAGGTGTGCCAAATACAATTGTGATCGACGGCTCCGGCTGGGGACAATATG
 CTCCCCGATCAAGGCCACGGCGTAGAGCTGCTGCAACACGATCCCAACCATAACATCT
 TATTTCCGTCCATATGTATGCCAACTATAATGATTCCAGTAAAATCGGCTCTGAGCTGC
 AGGCCATCAAGGACAAGGGGCTGGCGGTCATCGTGGGTGAGTTTGGCTACAACATAAC
 AATGGCAACAACAACCTGGGCACCACCGTGAATCCTTACGAGGTCATGAAGCAGTCTCA
 AGCCAAAGGCATCGGCTATCTGGCCTGGTCCTGGACGGGCAACAACAGTGAAAACGCAT
 GGCTTGATCTCGTGAACAGCAGTGACTGGAAAACGCCAACCGCATGGGGAAATACTGTG
 TTTAATGATGICAACGGCATCAAAAACACTTCGAAGAAAGCTTCGGTTTAC

SEQ ID NO:2 – Secuencia polipeptídica de Pkr Man3 natural precursor de *Paenibacillus kribbensis*. El péptido señal previsto se muestra en cursiva.

*MRDWRLYGKKA*FIFTIIFLLCSSVGLLNAGTSFAASGFYVSGNNLKDANGNNFVMRGVNNPHIW
 FDAQAYQALDAIAATKSNTVRIVWQTNGSAQRLGEIIERAKQLKLISVELHDVTGSNDANR
 LNDMARYFADPAVKKILADNQKYVLVNIANEWGDHNLSDAAWRDAYKTAITTLRNAGVPN
 TIVIDGSGWGQYASPIKAHGVELLQHDPNHNILFSVHMYANYNDSSKIGSELQAIKDKGLAVI
 VGEFGYNYNNGNNNLGTTVNPYEVMSQAKGIGYLAWSWTGNNSENAWLDLVNSSDWK
 TPTAWGNTVFNDVNGIKNTSKKASVY

SEQ ID NO:3 – Secuencia polipeptídica del Pkr Man3 maduro de *Paenibacillus kribbensis*.

ASGFYVSGNNLKDANGNNFVMRGVNNPHIWFDAQAYQALDAIAATKSNTVRIVWQTNGSA
 QRLGEIIERAKQLKLISVELHDVTGSNDANRLNDMARYFADPAVKKILADNQKYVLVNIAN
 EWGDHNLSDAAWRDAYKTAITTLRNAGVPNTIVIDGSGWGQYASPIKAHGVELLQHDPNHN
 ILFSVHMYANYNDSSKIGSELQAIKDKGLAVIVGEFGYNYNNGNNNLGTTVNPYEVMSQ
 AKGIGYLAWSWTGNNSENAWLDLVNSSDWKTPTAWGNTVFNDVNGIKNTSKKASVY

FIGURA 8B

SEQ ID NO:4 – Secuencia polipeptídica de “BamGh8” en el presente documento de la cepa FZB42 de *Bacillus amyloliquefaciens*.

MLKKLAVCLSIIVLLLLGAASPIAHTVYPVNPNAQQTTKDIMNWL AHLPNRSEN RVMSGAF
GGYSDVTFMTEENRLKNATGQSPAIFYGCDYGRGWLETADITDSIDYSCNSSLSIYWKSGGLP
QVSLHLANPAFSPGNYKTAISNSQYKNILDPSTVEGKRLEALLSKIADGLTQLKNQGVTVLFR
PLHEMNGEWFWWGLTGYNQKDNERISLYKELYKKIYRYMTETRGLDNLLWVYSPDANRDF
KTDYFPGSSYVDITGLDAYFTDPY AISGYDEMLSLKKPFAFAETGPSGNIGSFDYAAFNAIRQ
KYPETTYFLTWDEQLSPAANLGAQALYQNSWTLNKGEIWNNGGSLTPIAE

SEQ ID NO:5 – Secuencia polipeptídica de “Gte Man1” en el presente documento de *Geobacillus tepidamans*.

MKIGKWL VFFMSS TIVLSTISAYAQTSVTSSVSLSTVSQAKKQKNPSKPNKRVENLVDPLAT
DDTKSLFAYLKDVRGKQVLFHQHAIDEGLTLIGSKELESEVKNSVGDFAVFGWDITLSLEG
KEKPGVPNDPKQSRANLVASMKKVHKLGGHIALSAHMPNFVTGGSFNDDTGNVVEHILPGG
DKNAEFNSFLDNIAQFAKELKDDKQKQIPILFRPFHEQNGSWFWWGAKTTTPSQYIEIYRYTV
EYLRDCKG VHNFLYVYSPNGTFGGSEANYLTTYPGDDYVDILGMDQYDNQSNPGTTQFLT
LVKDLEMISKLADTKGKIAAFSEFGYSPQGMKTTGNGDLKWFVKVLNAIKADRNAKRIAYM
QTWANFGLNGNLFVYPYNDAPNGLGDHELLPDFINYYKDPYTAFLREVKG VYNNKVEAAKE
QPFMHASPTDNATVKTATTKIRVRVLNQKPSKVYVVEGSSKEVPMKLDADGYYSANWSP
VSKFNGKSVKITVKSYPNKTVMKQTVNVFVKVPEILIKQFTFDRDIKIRNIGTWPDITKN
FEHARLNGNGKLNITGMVRTDTWQEIKLELSNIKDIVPLSNVNRVKFDVLPVVSAGQQNA
NASLRGIIMLPPDWNEKYGMTTTEKALANLQVTINRVKYAEFPVMIDLNDPAKLSAAKGLV
LSIVNGLELNGAVYVDNIKLFSTYETPTDPALVDDFESYQGSNAVLQKQFVKAGGDITTVS
LDGSHKSSGTYAMKVDTLAGSGYAGVTKSLGGVDWSRFNKLKFWLTPDGKDKLVIQLR
VDGVYYEAYPSLASTTPGWVLFHFNDFTVAPWDTANLGKLNKISLKNVQDFAIYVNSKNG
TTLSS TLYFDDIKAIYDATAAASVPNGGTGPGSTPEQPGTLYDFETGVQGWVEVQANATTP
TITDAAAKGTHSLTSTFDLTKTGGFELTKVQVVDLSAVKTISAKVKISTGTANARLYIKTGS
NWQWHDSGMVAVDSSFEKTLTISLNPAGWIDNVKISIGVKIEPTSGTGNASVYVDDVALS

SEQ ID NO:8 – la secuencia polipeptídica señal aprE para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *B. subtilis*, por ejemplo.

MRSKKLWISLLFALTLIFTMAFSNMSAQA

SEQ ID NO:9 – una secuencia señal de xilanasa que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Trichoderma reesei*.

MVSFTSLLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKR

FIGURA 8C

SEQ ID NO:10 – otra secuencia señal de xilanasas que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Trichoderma reesei*.

MKANVILCLLAPLVAA

SEQ ID NO:11 – una secuencia señal de beta-glucosidasa que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Trichoderma reesei*.

MRYRTAAALALATGPFARA

SEQ ID NO:12 – una secuencia señal de celobiohidrolasa que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Trichoderma reesei*.

MIVGILTTLATLATAAS

SEQ ID NO:13 – una secuencia señal de celobiohidrolasa que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Trichoderma reesei*.

MYRKLAVISAFATARA

SEQ ID NO:14 – una secuencia señal Fv3CA que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MLNLQVAASALSLSLLGGLAEA

SEQ ID NO:15 – una secuencia señal Fv3C que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MKLNWVAAALSIGAAGTDS

SEQ ID NO:16 – una secuencia señal Fv3D que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MASIRSVLVSGLLAAGVNA

FIGURA 8D

SEQ ID NO:17 – una secuencia señal Fv43A que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MWLTSPLLFASTLLGLTGVALA

SEQ ID NO:18 – una secuencia señal Fv43B que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MRFSWLLCPLLAMGSA

SEQ ID NO:19 – una secuencia señal Fv43C que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MRLSFPSHLLVAFLTLKEASS

SEQ ID NO:20 – una secuencia señal Fv43D que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MQLKFLSSALLSLTGNCAA

SEQ ID NO:21 – una secuencia señal Fv43E que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MKVYWLVAWATSLTPALA

SEQ ID NO:22 – una secuencia señal Fv51A que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Fusarium verticillioides*.

MVRFSSILAAAACFVAVES

SEQ ID NO:23 – una secuencia señal Pa51A que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Podospora anserina*.

MIHLKPALAALLALSTQCVA

FIGURA 8E

SEQ ID NO:24 – una secuencia señal Pa3D que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Podospora anserina*.

MALQTFLLAAAMLANA

SEQ ID NO:25 – una secuencia señal Pa3G que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Podospora anserina*.

MKLNKPFLAIYLAFLNLAEA

SEQ ID NO:26 – una secuencia señal Cg51B que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Chaetomium globosum*.

MAPLSLRALSLLALTGAAAA

SEQ ID NO:27 – una secuencia señal de xilanasa que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Thermoascus aurantiacus*.

MVRPTILLTSLLLAPFAAA

SEQ ID NO:28 – una secuencia señal At10A que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Aspergillus terreus*.

MHMHSLVAALAAGTLPLLASA

SEQ ID NO:29 – una secuencia señal Af10A que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Aspergillus fumigatus*.

MVHLSSLAAALAALPLVYG

SEQ ID NO:30 – una secuencia señal Af10B que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Aspergillus fumigatus*.

MRFSLAATTLLAGLATA

FIGURA 8F

SEQ ID NO:31 – una secuencia señal Af10C que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Aspergillus fumigatus*.

MVVLSKLVSSILFASLVSA

SEQ ID NO:32 – una secuencia señal Ak10A que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Aspergillus kawachii*.

MVQIKAAALAMLFASHVLS

SEQ ID NO:33 – una secuencia señal de xilanasas que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en *Magnaporthe grisea*.

MKASSVLLGLAPLAALA

SEQ ID NO:34 – una secuencia señal mf(alfa) que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en levadura.

MRFPSIFTAVLFAASSALA

SEQ ID NO:35 – una secuencia señal pre-pro mf(alfa) que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en levadura.

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLL
FINTTIASIAAKEEGVSLDKR

SEQ ID NO:36 – una secuencia señal suc2 que puede utilizarse para la expresión de polipéptidos Pkr Man3 en levadura.

MLLQAFLFLLAGFAAKISAR