(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 712 635**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12Q 1/40 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2015** **PCT/EP2015/065752**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016** **WO16005521**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2015** **E 15736489 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 3167054**

(54) Título: **Proceso para producir etanol a partir de almidón usando una xilanasa GH5**

(30) Prioridad:

10.07.2014 EP 14176473
10.07.2014 EP 14176468
20.10.2014 EP 14189543

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2019

(73) Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es:

PEDERSEN, SVEN y
EKLOEF, JENS

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 712 635 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

Proceso para producir etanol a partir de almidón usando una xilanasa GH5

Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en una forma legible por ordenador.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón.

Descripción de las técnicas relacionadas

[0003] Los xilanos son hemicelulosas que se encuentran en todas las plantas terrestres (Popper y Tuohy, Plant Physiology, 2010, 153: 373-383). Son especialmente abundantes en las paredes celulares secundarias y las células de xilema. En las hierbas, con paredes celulares de tipo II, los glucurono arabinoxilanos son la hemicelulosa principal y están presentes como fibra alimentaria soluble o insoluble en muchos alimentos y piensos a base de hierbas.

[0004] Los xilanos de las plantas tienen un esqueleto de xilopiranosa unido en β-1,4 que se puede sustituir en la posición O2 u O3 con arabinosa, ácido glucurónico y ácido acético de una manera específica de especie y de tejido. Las semillas ricas en almidón de la *Panicoideae* con especies económicamente importantes tales como maíz y sorgo tienen tipos especiales de xilanos altamente sustituidos en sus paredes celulares. En comparación con la harina de trigo, donde más del 60% de las unidades de xilosilo en el esqueleto de arabinoxilano no están sustituidas. En el xilano de los granos de maíz, el porcentaje correspondiente de xilosilos del esqueleto no sustituidos es 20-30%, y en el sorgo es 35-40% (Huismann et al. Carbohydrate Polymers, 2000, 42: 269-279). Además, en el maíz y el sorgo, las cadenas laterales de xilano pueden ser más largas que una única sustitución de arabinosa o ácido glucurónico, lo que es común en otros xilanos. Esta complejidad añadida de cadenas laterales es a menudo debida a azúcares L- y D-galactosa y D-xilosa unidos a la cadena lateral arabinosa o ácido glucurónico. Aproximadamente cada décima arabinosa en el xilano del grano de maíz se esterifica también con un ácido ferúlico y aproximadamente cada cuarta xilosa lleva una acetilación (Agger et al. J. Agric. Food Chem, 2010, 58: 6141-6148). Todos estos factores combinados hacen que los xilanos altamente sustituidos en el maíz y el sorgo sean resistentes a la degradación por las xilanasas tradicionales.

[0005] Las enzimas conocidas responsables de la hidrólisis del esqueleto de xilano se clasifican en familias de enzimas basadas en la similitud de secuencia (www.cazy.org). Las enzimas con, principalmente, actividad endoxilanasa se han descrito previamente en la familia glicósido hidrolasa (GH) 5, 8, 10, 11 y 30. Las enzimas dentro de una familia comparten algunas características, tal como el plegamiento 3D, y comparten normalmente el mismo mecanismo de reacción. Algunas familias de GH tienen especificidades de sustrato estrechas o monoespecíficas, mientras que otras familias tienen especificidades de sustrato amplias.

[0006] Las xilanasas GH10 y GH11 disponibles comercialmente se usan a menudo para descomponer el esqueleto de xilosa del arabinoxilano. Sin embargo, tales xilanasas son sensibles al impedimento estérico de la cadena lateral y, aunque son eficaces en la degradación del arabinoxilano del trigo, no son muy eficaces en el xilano que se encuentra en las semillas de las especies de *Panicoideae*, tales como maíz o sorgo. El maíz se usa en todo el mundo, por ejemplo, en piensos y para producir bioetanol, y por tanto hay una necesidad de descubrir polipéptidos nuevos con actividad xilanasa que sean capaces de descomponer el esqueleto de xilano altamente ramificado en la pared celular para liberar más almidón que está atrapado dentro de la pared celular.

Resumen de la invención

[0007] Según la invención, se ha demostrado que varias xilanasas pertenecientes a la familia GH5 son eficaces en la hidrolización de los esqueletos de xilano altamente ramificados y, por tanto, estas xilanasas GH5 se pueden aplicar ventajosamente en procesos de almidón a etanol. La presente invención se refiere, por lo tanto, a un proceso para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

a) licuefacción de material que contiene almidón usando una alfa-amilasa;
b) sacarificación del material licuado usando una glucoamilasa;
c) fermentación usando un organismo fermentador, donde la sacarificación se realiza en presencia de una xilanasa GH5, donde la xilanasa GH5 se selecciona de la subfamilia 35.

Breve descripción de las figuras

[0008] La figura 1 muestra el efecto en el rendimiento de etanol al añadir una xilanasa GH5 durante la sacarificación. Un mosto licuado se dividió en tres partes y se realizó una sacarificación y una fermentación simultáneas. La fermentación se siguió por una pérdida de peso medida dos veces al día y por HPLC al final de la fermentación.

Definiciones

[0009] **Material que contiene arabinoxilano**: el término "material que contiene arabinoxilano" se refiere a cualquier material que contiene arabinoxilano. El arabinoxilano es una hemicelulosa que se encuentra en las paredes celulares primarias y secundarias de las plantas, incluidas las maderas y los granos de cereales, que consiste en copolímeros de dos azúcares pentosa, arabinosa y xilosa. La cadena de arabinoxilano contiene un gran número de unidades de xilosa con enlaces 1,4. Muchas unidades de xilosa están sustituidas con residuos de arabinosa sustituida en 2-, 3- o 2,3.

[0010] Ejemplos de material que contiene arabinoxilano son forraje, forraje basto, semillas y granos (bien enteros o preparados por trituración, molienda, etc., por ejemplo, de maíz, avena, centeno, cebada, trigo), árboles o maderas duras (tales como álamo, sauce, eucalipto, palma, arce, abedul), bambú, cultivos energéticos herbáceos y/o leñosos, cultivos agrícolas alimentarios y forrajeros, productos de pienso, cáscaras de mandioca, vainas de cacao, caña de azúcar, remolacha azucarera, pulpa de algarroba, bagazos de verduras o frutas, residuos de madera, corteza, virutas, serrín, pulpa de madera, licor de fabricación de pasta, residuos de papel, cartón, residuos de madera de construcción y demolición, sólidos o lodos de aguas residuales industriales o municipales, estiércol, subproducto de procesos de la elaboración de cerveza y/o fermentación, residuos de destilería húmedos, residuos de destilería secos, grano agotado, vinaza y bagazo.

[0011] El forraje tal y como se define en la presente incluye también forraje basto. El forraje es material vegetal fresco tal como heno y ensilaje de plantas forrajeras, hierbas y otras plantas forrajeras, hierbas y otras plantas forrajeras, algas, granos germinados y legumbres, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de plantas forrajeras son alfalfa (mielga), cuernecillo, crucíferas (por ejemplo, col, colza (canola), naba (colinabo), nabo), tréboles (por ejemplo, trébol híbrido, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco), hierbas (por ejemplo, grama, bromo, hierba triguera, festuca, triguillo del agua, poas, *Miscanthus*, pasto ovillo, raigrás, pasto varilla, fleo de los prados), maíz, cáñamo, mijo, cebada, avena, centeno, sorgo, soja y trigo y verduras tales como las remolachas. Plantas de cultivo adecuadas para ensilaje son las hierbas ordinarias, los tréboles, la alfalfa, las algarrobas, la avena, el centeno y el maíz. El forraje además incluye residuos de cultivos de la producción de grano (tal como rastrojos de maíz; paja de trigo, cebada, avena, centeno y otros granos); residuos de verduras como hojas de remolacha; residuos de la producción de semillas oleaginosas como tallos y hojas de soja, colza y otras legumbres; y fracciones de la refinación de granos para consumo animal o humano o de la producción de combustible u otras industrias.

[0012] El forraje basto es material vegetal generalmente seco con altos niveles de fibra, tal como fibra, salvado, cáscaras de semillas y granos y residuos de cultivos (tales como rastrojos, copra, paja, cascarillas, residuos de remolacha azucarera).

[0013] Las fuentes preferidas de materiales que contienen arabinoxilano son forraje, forraje basto, semillas y granos, caña de azúcar, remolacha azucarera y pulpa de madera.

[0014] **ADNc**: el término "ADNc" se refiere a una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm empalmado maduro obtenida de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, incluido el empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

[0015] **Secuencia codificante**: el término "secuencia codificante" se refiere a un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante están determinados generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como ATG,

GTG o TTG y termina con un codón de parada tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de los mismos.

[0016] **Secuencias de control**: el término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o exógena (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativa o exógena entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden proporcionarse con conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0017] **Expresión**: el término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0018] **Vector de expresión**: el término "vector de expresión" se refiere a una molécula lineal o circular de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está unido operativamente a secuencias de control que proveen a su expresión.

[0019] **Xilano altamente ramificado**: el término "xilano altamente ramificado" se refiere a que más del 50% de las unidades de xilosilo en el esqueleto de arabinoxilano están sustituidas. Esto se calcula preferiblemente a partir de un análisis de ligamiento como el realizado en Huismann et al. Carbohydrate Polymers, 2000, 42: 269-279.

[0020] **Célula huésped**: el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo celular que es susceptible a la transformación, transfección, transducción o similar con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula parental que no sea idéntica a la célula parental debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

[0021] **Aislado**: el término "aislado" se refiere a una sustancia en una forma o entorno que no ocurre en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen 1) cualquier sustancia que no ocurre de forma natural, 2) cualquier sustancia que incluye, pero no se limita a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se extrae al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los cuales está asociado en la naturaleza; 3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o 4) cualquier sustancia modificada aumentando la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales está asociada naturalmente (por ejemplo, producción recombinante en una célula huésped; copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; y uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia).

[0022] **Polipéptido maduro**: el término "polipéptido maduro" se refiere a un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como el procesamiento N-terminal, el truncamiento C-terminal, la glicosilación, la fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 37 a 573 de la SEQ ID N.º: 2. Los aminoácidos 1 a 27 de la SEQ ID N.º: 2 son un péptido señal. Los aminoácidos 28 a 36 de la SEQ ID N.º: 2 son una etiqueta de polihistidina. En otro aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 36 a 582 de la SEQ ID N.º: 4. Los aminoácidos 1 a 27 de la SEQ ID N.º: 4 está constituido por un péptido señal. Los aminoácidos 28 a 35 de la SEQ ID N.º: 4 son una etiqueta de polihistidina.

[0023] Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresado por el mismo polinucleótido. También se conoce en la técnica que diferentes células huésped procesan los polipéptidos de manera diferente, y así, una célula huésped que expresa un polinucleótido puede producir un polipéptido maduro diferente (por ejemplo, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) en comparación con otra célula huésped que expresa el mismo polinucleótido.

[0024] **Secuencia codificante del polipéptido maduro**: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad xilanasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro está constituida por los nucleótidos 109 a 1719 de la SEQ ID N.º: 1. Los nucleótidos 1 a 81 de la SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal. Los nucleótidos 82 a 108 de la SEQ ID N.º: 1 codifican una etiqueta de polihistidina. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido

maduro está constituida por los nucleótidos 106 a 1746 de la SEQ ID N.º: 3. Los nucleótidos 1 a 81 de la SEQ ID N.º: 3 codifican un péptido señal. Los nucleótidos 82 a 105 de la SEQ ID N.º: 3 codifican una etiqueta de polihistidina.

[0025] **Composición de oligosacáridos**: el término "composición de oligosacáridos" se refiere a oligo- y polisacáridos, pero no incluye mono- y disacáridos (GP1 y GP2).

[0026] **Construcción de ácidos nucleicos**: el término "construcción de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien mono- o bicatenaria, que se aisla de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

[0027] **Unido operativamente**: el término "unido operativamente" se refiere a una configuración donde una secuencia de control se coloca en una posición apropiada respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0028] **Porcentaje de xilosa solubilizada**: el término "porcentaje de xilosa solubilizada" se refiere a la cantidad de xilosa medida en el sobrenadante tras la incubación con una enzima en comparación con la cantidad total de xilosa presente en el sustrato antes de la incubación con la enzima. El porcentaje de xilosa solubilizada de maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) se puede calcular como se describe en la presente en el ejemplo 3.

[0029] **Identidad de secuencia**: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

[0030] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Se usó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

[0031] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Se usó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento).

[0032] **Xilanasa**: el término "xilanasa" se refiere a una 1,4-beta-D-xilan-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en los xilanos. La actividad xilanasa se puede determinar con AZCL-arabinoxilano al 0,2% como sustrato en TRITON® X-100 al 0,01% y 200 mM de fosfato sódico pH 6 a 37 ºC. Una unidad de actividad xilanasa se define como 1,0 µmol de azurina producida por minuto a 37 ºC, pH 6 de AZCL-arabinoxilano al 0,2% como sustrato en 200 mM de fosfato sódico pH 6.

[0033] **Xilanasa GH5**: las xilanasas descritas en esta invención pertenecen a GH5, una familia GH con una amplia variedad de especificidades de sustrato. La relación entre secuencias dentro de GH5 se ha clarificado definiendo subfamilias de secuencias relacionadas (Aspeborg et al. BMC Evolutionary Biology, 2012, 12:186). Subdividir una familia GH en subfamilias ha mejorado significativamente la potencia predictiva para la especificidad de sustrato, no solo para GH5 (Lombard et al. Nucleic Acids Res, 2014, 42: D490-D495). Dos de las subfamilias de GH5, GH5_21 y GH5_34, se han descrito como xilanasas que actúan sobre arabinoxilano. De manera interesante, estas dos subfamilias de xilanasa no están estrechamente relacionadas y son el resultado de una evolución convergente. Durante el curso de este trabajo, se ha descubierto que los miembros de la subfamilia GH5_35, una subfamilia de función previamente desconocida, tienen actividad xilanasa.

Descripción detallada de la invención

[0034] Los inventores han descubierto que determinadas xilanasas de la familia glicósido hidrolasa 5 (en la presente denominada GH5) son sorprendentemente buenas para degradar el esqueleto de xilosa de arabinoxilano estéricamente impedido, liberando así mayores cantidades de xilosa. En particular, las xilanasas GH5 pertenecientes a la subfamilia GH5_35 tienen la capacidad para acceder y degradar xilanos altamente ramificados (que se refiere a que más del 50% de las unidades de xilosilo en el esqueleto del arabinoxilano están sustituidas) que son resistentes a la degradación por xilanasa por xilanasas de otras familias GH. La mayor degradación, y así mayor liberación de xilosa, aumenta la accesibilidad del almidón atrapado en la estructura de xilosa. Por tanto, la presente invención se refiere a un proceso para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

a) licuefacción del material que contiene almidón usando una alfa-amilasa;
b) sacarificación del material licuado usando una glucoamilasa;
c) fermentación usando un organismo fermentador, donde la sacarificación se realiza en presencia de una xilanasa GH5, donde la xilanasa GH5 se selecciona de la subfamilia 35.

Xilanasas GH5

[0035] Las xilanasas GH5 aplicadas en el proceso de la invención se seleccionan, en una forma de realización, de la subfamilia 35.

[0036] En una forma de realización específica, la xilanasa GH5 de la subfamilia 35 se selecciona de la xilanasa representada por los aminoácidos 37 a 573 de la SEQ ID N.º: 2, o una xilanasa GH5 que tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% de identidad con los aminoácidos 37 a 573 de la SEQ ID N.º: 2.

[0037] En otra forma de realización específica, la xilanasa GH5 de la subfamilia 35 se selecciona de la xilanasa representada por los aminoácidos 36 a 582 de la SEQ ID N.º: 4, o una xilanasa GH5 que tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% de identidad con los aminoácidos 36 a 582 de la SEQ ID N.º: 4.

Producción de productos de fermentación a partir de materiales que contienen almidón

[0038] Procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón gelatinizado. En este aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, proceso que incluye una etapa de licuefacción y etapas de sacarificación y fermentación realizadas consecutiva o simultáneamente.

[0039] La invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón usando una alfa-amilasa:
ii) sacarificación del material licuado usando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
iii) fermentación usando un organismo fermentador, donde la sacarificación se realiza en presencia de una xilanasa GH5, donde la xilanasa GH5 se selecciona de la subfamilia 35.

[0040] El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, puede recuperarse opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. Los materiales de partida que contienen almidón adecuados se enumeran en la sección "materiales que contienen almidón" más adelante. En una forma de realización, los materiales que contienen almidón son maíz o trigo. Las enzimas contempladas se enumeran en la sección de "enzimas" más adelante. La licuefacción se realiza en presencia de una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana, especialmente una alfa-amilasa de *Bacillus*, tal como una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*. El organismo fermentador es preferiblemente levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*, especialmente una cepa de *Saccharomyces cerevisae*. Los organismos fermentadores adecuados se enumeran en la sección "organismos fermentadores" más adelante. En una forma de realización preferida, las etapas ii) y iii) se realizan consecutiva o simultáneamente (es decir, como proceso de SSF).

[0041] La suspensión acuosa puede contener 10-55% en peso de sólidos secos, preferiblemente 25-45% en peso de sólidos secos, más preferiblemente 30-40% en peso de sólidos secos de material que contiene almidón. La suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización inicial. Se puede añadir alfa-amilasa, alfa-amilasa preferiblemente bacteriana, a la suspensión. En una forma de realización, la suspensión también se

cuece con vapor a presión para gelatinizar adicionalmente la suspensión antes de ser sometida a una alfa-amilasa en la etapa i) de licuefacción.

[0042] La temperatura durante la etapa i) está por encima de la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 80-90 ºC, tal como alrededor de 85 ºC.

[0043] En una forma de realización, la licuefacción se realiza como un proceso de suspensión en caliente de tres etapas. La suspensión se calienta entre 60-95 ºC, preferiblemente entre 80-90 ºC, y se añade alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (disolución). Luego, la suspensión se cuece con vapor a presión a una temperatura de entre 95 y 140 ºC, preferiblemente 105-125 ºC, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. La suspensión se enfría a 60-95 ºC, preferiblemente 80-90 ºC, y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a pH 4,5-6,5, en particular a un pH entre 5 y 6. El almidón molido y licuado se conoce como "mosto".

[0044] La sacarificación de la etapa ii) se puede realizar usando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completa puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas. En una forma de realización, se realiza una etapa de presacarificación de 40-90 minutos a una temperatura de entre 30 y 65 ºC, típicamente a alrededor de 60 ºC, seguida de una sacarificación completa durante la fermentación en una etapa de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 30-70 ºC, tal como 55-65 ºC, típicamente alrededor de 60 ºC, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a alrededor de pH 4,5.

[0045] El proceso más ampliamente usado en la producción de producto de fermentación, especialmente la producción de etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), donde no hay fase de retención para la sacarificación.

[0046] La SSF puede realizarse típicamente a una temperatura de entre 25 ºC y 40 ºC, tal como entre 28 ºC y 36 ºC, tal como entre 30 ºC y 34 ºC, tal como alrededor de 32 ºC, cuando el organismo de fermentación es levadura, tal como una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, y el producto de fermentación deseado es etanol. En una forma de realización, la fermentación está en progreso durante 6 a 120 horas, en particular de 24 a 96 horas.

[0047] Otros productos de fermentación se pueden fermentar en condiciones y temperaturas, bien conocidas por la persona experta en la técnica, adecuadas para el organismo fermentador en cuestión. Según la invención, la temperatura se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación.

[0048] En una forma de realización, se añade una proteasa durante la fermentación. Se pueden encontrar ejemplos de proteasas en la sección "proteasas" más adelante.

[0049] En una forma de realización preferida, la etapa ii) y la etapa iii) se realizan como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. En tal forma de realización preferida, el proceso se realiza típicamente a una temperatura entre 25 ºC y 40 ºC, tal como entre 28 ºC y 36 ºC, tal como entre 30 ºC y 34 ºC, tal como alrededor de 32 ºC. Según la invención, la temperatura se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación.

[0050] En una forma de realización, se realiza la sacarificación y fermentación simultáneas de modo que el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se mantiene en un nivel bajo tal como por debajo del 6% en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente el 3% en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente el 2% en peso, más preferido por debajo de aproximadamente el 1% en peso, aún más preferido por debajo de aproximadamente el 0,5%, o aún más preferido el 0,25% en peso, tal como por debajo de aproximadamente el 0,1% en peso. Se pueden conseguir tales bajos niveles de azúcar utilzando sencillamente cantidades ajustadas de enzima y organismo fermentador. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente qué cantidades de enzima y organismo fermentador usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo fermentador también se pueden seleccionar para mantener concentraciones bajas de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener por debajo de aproximadamente el 0,5% en peso o por debajo de aproximadamente el 0,2% en peso.

[0051] El proceso de la invención se puede realizar a un pH en el intervalo entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3,5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

[0052] En una forma de realización, se añade una proteasa durante la fermentación. Ejemplos de proteasas se pueden encontrar en la sección de "proteasas" más adelante.

Materiales que contienen almidón

[0053] Según la invención, los azúcares pueden derivarse de materiales que contienen almidón. Cualquier material de partida que contiene almidón adecuado, incluido almidón granulado, se puede usar según la presente invención. El material de partida se selecciona generalmente en base al producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales de partida que contienen almidón, adecuados para usar en un proceso de la presente invención, incluyen granos enteros, granos de maíz, trigo, cebada, centeno, triticale, sorgo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias y boniatos, o mezclas de los mismos, o cereales, o materias primas que contienen azúcar, tal como melaza, materiales de fruta, caña de azúcar o remolacha azucarera, patatas. Se contemplan tipos tanto cerosos como no cerosos de maíz y cebada.

[0054] En una forma de realización particular, el material que contiene almidón incluye maíz, granos de maíz, trigo, centeno, cebada, triticale, sorgo, pasto varilla, mijo, mijo perla, panizo o en una forma procesada tal como granos de maíz molidos, trigo molido, centeno molido, cebada molida, triticale molido, maíz molido, maíz desgrasado, maíz desgrasado desalmidonado, sorgo molido, pasto varilla molido, mijo molido, panizo molido, mijo perla molido.

[0055] Particularmente, el material a base de almidón incluye maíz, sorgo, trigo, centeno, cebada o triticale.

[0056] El término "almidón granulado" se refiere a almidón crudo sin cocer, es decir, almidón en su forma natural encontrado en cereales, tubérculos o granos. El almidón se forma dentro de células vegetales como pequeños gránulos insolubles en agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50 ºC a 75 ºC, el hinchamiento puede ser reversible. Sin embargo, con temperaturas más altas empieza un hinchamiento irreversible llamado "gelatinización". El almidón granulado que se va a procesar puede, en una forma de realización, ser un almidón altamente refinado, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99,5% puro, o puede ser un material que contiene almidón más crudo que comprende grano entero molido que incluye fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como grano entero, se muele para abrir la estructura y permitir un procesamiento posterior. Se prefieren dos procesos de molienda según la invención: molienda húmeda y seca. En la molienda seca, se muelen y se usan granos enteros. La molienda húmeda proporciona una buena separación de germen y harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica a menudo en ubicaciones donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de jarabes. Tanto la molienda seca como la húmeda son bien conocidas en la técnica del procesamiento de almidón y se contempla igualmente para el proceso de la invención.

[0057] El material que contiene almidón se puede reducir en tamaño de partícula, preferiblemente por molienda seca o húmeda, para exponer más área de superficie. En una forma de realización, el tamaño de partícula es de entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, aún más preferiblemente al menos el 90% del material que contiene almidón se ajuste a través de un tamiz con un filtro de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente un filtro de 0,1-0,5 mm.

Organismos fermentadores

[0058] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluidos organismos bacterianos y fúngicos, incluidos levadura y hongos filamentosos, adecuados para producir un producto de fermentación deseado. Los organismos fermentadores especialmente adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir azúcares, tales como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y/o arabinosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tal como levadura. La levadura preferida incluye cepas del género *Saccharomyces*, en particular una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, en particular *Pichia stipitis* o *Pichia pastoris*; una cepa del género *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis* o *Candida boidinii*. Otras levaduras contempladas incluyen cepas de *Hansenula*, en particular *Hansenula polymorpha* o *Hansenula anomala*; cepas de *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces marxianus* o *Kluyveromyces fagilis*, y cepas de *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*.

[0059] En una forma de realización, el organismo fermentador es un organismo fermentador de azúcar C6 (hexosa), tal como una cepa de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0060] En relación especialmente con la fermentación de materiales derivados de lignocelulosa, también se contemplan los organismos fermentadores de azúcar C5 (pentosa). La mayoría de los organismos fermentadores

de azúcar C5 también fermentan azúcares C6. Los ejemplos de organismos fermentadores de azúcar C5 incluyen cepas de *Pichia*, tal como de la especie *Pichia stipitis*. También se conocen bacterias fermentadoras de azúcar C5. También algunas cepas de *Saccharomyces cerevisae* fermentan azúcares C5 (y C6). Ejemplos son cepas genéticamente modificadas de *Saccharomyces spp* que son capaces de fermentar azúcares C5 e incluyen aquellas referidas en, por ejemplo, Ho et al., 1998, Applied and Environmental Microbiology, p. 1852-1859 y Karhumaa et al., 2006, Microbial Cell Factories 5:18.

[0061] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade en la fermentación de modo que el recuento de organismo fermentador viable, tal como levadura, por ml de medio de fermentación esté en el intervalo de 10^5 a 10^{12}, preferiblemente de 10^7 a 10^{10}, especialmente aproximadamente $5x10^7$.

[0062] La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE.UU.), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, EE.UU.), levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EE.UU.), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU.), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

[0063] El organismo fermentador capaz de producir un producto de fermentación deseado de azúcares fermentables, incluidos glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y/o arabinosa, se cultiva preferiblemente bajo condiciones precisas a una velocidad de crecimiento particular. Cuando el organismo fermentador se introduce en/se añade al medio de fermentación, el organismo fermentador inoculado pasa a través de varias etapas. Inicialmente no se produce crecimiento. Este periodo se denomina la "fase de latencia" y se puede considerar un periodo de adaptación. Durante la fase siguiente denominada la "fase exponencial", la velocidad de crecimiento aumenta gradualmente. Después de un periodo de crecimiento máximo, la velocidad cesa y el organismo fermentador entra en la "fase estacionaria". Después de un periodo de tiempo adicional, el organismo fermentador entra en la "fase de muerte" donde desciende el número de células viables.

Productos de fermentación

[0064] El término "producto de fermentación" se refiere a un producto producido en un proceso que incluye una etapa de fermentación usando un organismo fermentador. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H_2 y CO_2); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B_{12}, beta-caroteno); y hormonas.

[0065] En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol para beber, es decir, bebidas espirituosas neutrales potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos incluyen cerveza *ale*, cerveza *stout*, cerveza *porter*, cerveza *lager*, bíters, licores de malta, cerveza *happoushu*, cerveza con alto contenido de alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera.

Fermentación

[0066] Los azúcares derivados de material vegetal usados en la fermentación en un proceso de la invención se pueden derivar a partir de material que contiene almidón y/o material que contiene lignocelulosa. Las condiciones de fermentación se determinan en función de, por ejemplo, el tipo de material vegetal, los azúcares fermentables, el organismo fermentador y/o el producto de fermentación deseado. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de fermentación adecuadas. La fermentación puede, según la invención, realizarse en condiciones usadas de forma convencional. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos anaeróbicos.

Fermentación de azúcares derivados de materiales que contienen almidón

[0067] Como se ha mencionado anteriormente, se pueden usar tipos diferentes de organismos fermentadores para fermentar azúcares derivados a partir de material que contiene almidón. Las fermentaciones se realizan a menudo usando levadura, tal como *Saccharomyces cerevisae*, como organismo fermentador. Sin embargo, también se pueden usar bacterias y hongos filamentosos como organismos fermentadores. Algunas bacterias tienen una temperatura de fermentación óptima más alta que, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisae*. Por lo tanto, las fermentaciones pueden, en tales casos, realizarse a temperaturas tan altas como 75 ºC, por ejemplo, entre 40 y 70 ºC, tal como entre 50 y 60 ºC. Sin embargo, también se conocen bacterias con una temperatura

óptima significativamente inferior hasta alrededor de temperatura ambiente (alrededor de 20 ºC). Se pueden encontrar ejemplos de organismos fermentadores adecuados en la sección "organismos fermentadores " anterior.

[0068] Para la producción de etanol usando levadura, la fermentación puede, en una forma de realización, seguir durante 24 a 96 horas, en particular durante 36 a 72 horas. En una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura de entre 20 a 40 ºC, preferiblemente de 28 a 36 ºC, en particular alrededor de 32 ºC. En una forma de realización, el pH es de pH 3 a 6, preferiblemente alrededor de pH 4 a 5.

[0069] Se contempla especialmente la hidrólisis/sacarificación y fermentación simultáneas (mencionada como "SSF") donde no hay fase de retención separada para la hidrólisis/sacarificación, lo que se refiere a que la(s) enzima(s) hidrolizante(s), el/los organismo(s) de fermentación y la proteína calmodulina se pueden añadir juntos. Sin embargo, se debe entender que la proteína de calmodulina también se puede añadir de forma separada. Cuando la fermentación se realiza simultáneamente con la sacarificación (es decir, SSF) la temperatura es preferiblemente de entre 20 y 40 ºC, preferiblemente de 28 a 36 ºC, en particular alrededor de 32 ºC cuando el organismo de fermentación es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y el producto de fermentación deseado es etanol.

[0070] Otros productos de fermentación se pueden fermentar a temperaturas conocidas por la persona experta en la técnica que sean adecuadas para el organismo fermentador en cuestión.

[0071] El proceso de la invención se puede realizar como un proceso por lotes o como uno continuo. El proceso de fermentación de la invención se puede llevar a cabo en un sistema de ultrafiltración donde la fracción retenida se mantiene bajo recirculación en presencia de sólidos, agua y el organismo fermentador, y donde el permeato es el producto de fermentación deseado que contiene líquido. Se contempla igualmente si el proceso se lleva a cabo en un reactor de membrana continuo con membranas de ultrafiltración y donde la fracción retenida se mantiene bajo recirculación en presencia de sólidos, agua, el organismo fermentador y donde el permeado es el producto de fermentación que contiene líquido.

[0072] Después de la fermentación, el organismo fermentador se puede separar de la suspensión fermentada y reciclarse.

[0073] Las fermentaciones se realizan típicamente a un pH en el intervalo de entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3,5 a 6, tal como alrededor de pH 5. Las fermentaciones están en progreso típicamente durante 24-96 horas.

Métodos y procesos según la invención

[0074] El aspecto principal según la presente invención se refiere a procesos para hidrolizar material que contiene almidón a azúcares y fermentar posteriormente los azúcares a alcohol, particularmente etanol, donde una xilanasa GH5 de la subfamilia 35 está presente durante la hidrólisis. Los diferentes procesos y condiciones del proceso se han descrito anteriormente.

[0075] Un aspecto particular de la invención se refiere a un proceso para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

a) licuefacción del material que contiene almidón usando una alfa-amilasa:
b) sacarificación del material licuado usando una glucoamilasa;
c) fermentación usando un organismo fermentador, donde la sacarificación se realiza en presencia de una xilanasa GH5, donde la xilanasa GH5 se selecciona de la subfamilia 35.

[0076] En una forma de realización particular, el material que contiene almidón incluye maíz, granos de maíz, trigo, centeno, cebada, triticale, sorgo, pasto varilla, mijo, mijo perla, panizo o en una forma procesada tal como granos de maíz molidos, trigo molido, centeno molido, cebada molida, triticale molido, maíz molido, maíz desgrasado, maíz desgrasado desalmidonado, sorgo molido, pasto varilla molido, mijo molido, panizo molido, mijo perla molido.

[0077] Particularmente, el material a base de almidón incluye maíz, sorgo, trigo, centeno, cebada o triticale.

[0078] Las xilanasas GH5 son particularmente eficaces sobre xilanos altamente ramificados y así, en una forma de realización, el material que contiene almidón incluye xilano altamente ramificado.

[0079] Las xilanasas GH5 se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en la subfamilia 21, 34 o 35.

[0080] En una forma de realización específica, la xilanasa GH5 de la subfamilia 35 se selecciona de la xilanasa representada por los aminoácidos 37 a 573 de la SEQ ID N.º: 2, o una xilanasa GH5 que tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% de identidad con los aminoácidos 37 a 573 de la SEQ ID N.º: 2.

[0081] En otra forma de realización específica, la xilanasa GH5 de la subfamilia 35 se selecciona de la xilanasa representada por los aminoácidos 36 a 582 de la SEQ ID N.º: 4, o una xilanasa GH5 que tiene al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% de identidad con los aminoácidos 36 a 582 de la SEQ ID N.º: 4.

[0082] El producto de fermentación es, en una forma de realización, un alcohol, particularmente etanol.

[0083] La sacarificación y la fermentación se pueden realizar separada o simultáneamente. El organismo fermentador es preferiblemente una *Saccharomyces* sp., más particularmente *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas de levadura comerciales adecuadas disponibles se han descrito en la presente en la sección "organismos fermentadores".

[0084] La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Medios y soluciones

Preparación de maíz desalmidonado (MDA)

[0085] Se mezclaron 107 kg de maíz molido (<10 mm) en un tanque con 253 kg de agua del grifo a 53 ºC para hacer una suspensión. La temperatura de la suspensión fue 47 ºC y el pH 5,9. El pH se ajustó a 6,15 con 1 l de 1 N de NaOH y el tanque se calentó luego a 95 ºC. Se añadieron 1,119 kg de alfa-amilasa Termamyl® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) a 52 ºC y se incubó durante 80 minutos a 95 ºC. El pH medido al final de la incubación fue 6,17. Se añadió agua del grifo fría a la suspensión y la suspensión se centrifugó y decantó 3 veces usando un decantador Westfalia CA-225-110 (4950±10 rpm, flujo ~600 l/h) lo que dió 64,5 kg de residuo. Luego se recogió el residuo, se congeló y se liofilizó para proporcionar 17,1 kg de maíz desalmidonado (MDA).

Preparación de maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA)

[0086] Se añadieron 500 ml de acetona a 100 gramos de maíz desalmidonado, preparado como se ha descrito anteriormente. La suspensión se agitó durante 5 minutos y se dejó asentar. La acetona se decantó y el procedimiento se repitió 2 veces. El residuo se secó al aire durante toda la noche para proporcionar maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) que se almacenó a temperatura ambiente.

Preparación de sorgo desalmidonado

[0087] Las semillas de sorgo entero se molieron y tamizaron y una fracción por debajo de 0,5 mm se usó para un procesamiento posterior. La fracción tamizada se suspendió en 25 mM de NaOAc pH 5,5 al 20% de materia seca y se desalmidonó. El desalmidonado implicó una primera etapa a 85 ºC con 500 ppm de alfa-amilasa Termamyl SC (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) durante 20 min seguida de una incubación durante toda la noche usando 250 ppm de Attenuzyme Flex (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) a 65 ºC. La suspensión se centrifugó y se decantó el líquido. Después de esto, se realizó otro desalmidonado añadiendo agua MilliQ y 200 ppm de Termamyl SC y 200 ppm de Attenuzyme Flex e incubando durante toda la noche a 65 ºC.

[0088] La fibra de sorgo se separó del líquido por filtración al vacío a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman F. La torta de filtración se lavó luego varias veces con exceso de agua para eliminar azúcares solubles. Finalmente, la fibra de sorgo desalmidonado se secó en un horno a 65 ºC y la fibra seca se molió rápidamente en un molinillo de café de modo que el tamaño de partícula fue en general menos de 1 mm.

Preparación de goma de fibra de maíz

Desalmidonado de maíz

[0089] Se mezclaron 107 kg de maíz premolido (<1,0 mm) con 253 kg de agua a 53 ºC. La mezcla se calentó a 95 ºC y el pH se ajustó a 6,2 con 1 M de NaOH. Se añadieron 1,12 kg de Termamyl 120 L (una alfa amilasa comercial disponible de Novozymes A/S) y la reacción se mantuvo a alrededor de 90 ºC durante 3 h. Después de 3 h, se añadió agua fría hasta un peso de reacción total de 600 kg. La separación de sólidos y líquidos se realizó con un decantador Westfalia, CA-225-110, 4950 rpm, flujo 600 l/hora. La fracción de fibra sólida se resuspendió y separó dos veces con agua hasta un peso total de 600 kg seguido de una separación como se ha descrito anteriormente. La fracción de fibra final se dividió en partes menores y se liofilizó durante 3-4 días.

[0090] Termamyl 120 L es una alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, sin embargo, también se pueden usar otras alfa-amilasas ácidas que muestran buena estabilidad a la temperatura. Los ejemplos incluyen alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una deleción doble que corresponde a delta(181-182) y además incluyen una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID N.º: 3 descrita en WO 99/19467.

Extracción de goma de fibra de maíz

[0091] Se añadieron 20 g de maíz desalmidonado a 200 ml de agua MilliQ™ hirviendo junto con 0,8 g de NaOH y 0,8 g de $Ca(OH)_2$. La mezcla se mantuvo durante 1 hora a 96 ºC y luego se centrifugó durante 20 min a 6000 g.

[0092] El sobrenadante tenía un aspecto lechoso y graso y, por lo tanto, las grasas se extrajeron mediante agitación con hexano (1 parte de hexano a 4 partes de goma de fibra de maíz). Después de un tiempo de reposo, el hexano se eliminó mediante pipeteo.

[0093] Se realizó una 2ª extracción (CFG2) disolviendo el granulado en 200 ml de 1 M de NaOH. La mezcla se mantuvo durante 1 hora a 96 ºC y luego se centrifugó durante 20 min a 6000 g y el sobrenadante se ajustó a pH 6 con 4 M de HCl.

[0094] Ambas fracciones de CFG se concentraron usando un rotavapor y se precipitaron en EtOH a una concentración final del 90%. El sedimento del NaOH 0,1 M se llamará de ahora en adelante CFG1. Debido al alto pH en un extracto en 1 M de NaOH (CFG2), esta fracción se dializó en una probeta de 2 l con agua desionizada con el grifo goteando durante toda la noche usando una membrana de diálisis de 3 kDa.

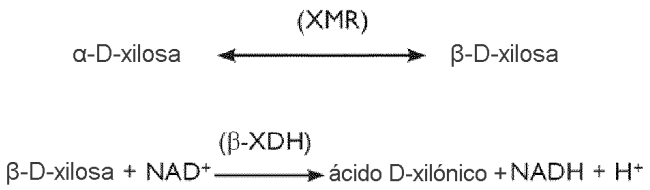
[0095] Antes de las pruebas de aplicación, tanto CFG1 como CFG2 se centrifugaron a 25000 g durante 25 min y se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,44 µm. Se determinó la materia seca en las fracciones CFG2 con un Mettler Toledo HR73.

Ensayos

Ensayo de xilosa

[0096] Se preparó una curva estándar de xilosa de 0 a 125 µg de xilosa/ml a partir de una solución madre de 2,5 mg de xilosa/ml (preparada disolviendo 0,125 g de xilosa en 50 ml de agua desionizada).

[0097] Principio de ensayo. La interconversión de las formas anoméricas α y β de la D-xilosa está catalizada por la xilosa mutarrotasa (XMR) usando el kit de ensayo de D-xilosa de Megazyme International Ireland. La β-D-xilosa se oxida por NAD^+ a ácido D-xilónico en presencia de ß-xilosa deshidrogenasa (β-XDH) a pH 7,5. La cantidad de NADH formada en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de D-xilosa y se mide por el aumento de la absorbancia a 340 nm.



Ejemplo 1: clonación de xilanasas GH5

Cepas donadoras

[0098] La xilanasa de *Acetivibrio cellulolyticus* CD2 se identificó en parte de su secuencia de genoma público como se publicó originalmente bajo el número de acceso UniProt: E1KC96 (Lucas S., Copeland A., Lapidus A., Cheng J.-F., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Land M.L., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C., Mouttaki H., He Z., Zhou J., Hemme C.L., Woyke T.J.; "The draft genome of Acetivibrio cellulolyticus CD2."; enviado (ago-2010) a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ). La xilanasa también se ha publicado en Hemme CL, Mouttaki H, Lee YJ, Zhang G, Goodwin L, Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Glavina del Rio T, Tice H, et al.: Sequencing of multiple clostridial genomes related to biomass conversion and biofuel production. J Bacteriol 2010, 192(24): 6494-6496. Uniprot: E1KC96 es la SEQ ID N.º: 7 y la SEQ ID N.º: 8 son ambas xilanasas GH5_34.

[0099] La xilanasa de las cepas *Paenibacillus* sp. 18054 (SEQ ID N.º: 3 y 4) y *Paenibacillus illinoisensis* (SEQ ID N.º: 1 y 2) se identificaron por secuenciación aleatoria del genoma. Ambas xilanasas pertenecen a la familia GH5_35. Las cepas se aislaron a partir de una muestra termal de Nueva Zelanda en 1991. *P. illionensis* está depositada como DSMZ bajo el número de acceso DSM16232.

[0100] La xilanasa del metagenoma de estiércol de elefante (SEQ ID N.º: 5 y 6) pertenece a la familia GH5_21 y se obtuvo por secuenciación profunda de un extracto de metagenoma. Se usó el estiércol de un elefante asiático hembra de seis años (de nombre "Kandy") que vivía en el jardín zoológico de Hamburgo, Alemania. El aislamiento del ADN se realizó con el kit QIAamp DNA Stool kit de Qiagen (Hilden, Alemania) como se describe en el protocolo del fabricante.

[0101] La secuenciación del genoma, el ensamblaje posterior de las lecturas y el descubrimiento del gen (es decir, la anotación de las funciones del gen) las conoce el experto en la técnica y el servicio se puede comprar comercialmente.

Ejemplos de clonación

[0102] En base a las secuencias de nucleótidos mencionadas en la sección/el ejemplo "cepas donadoras", se sintetizó y compró comercialmente un gen sintético con optimización de codones por xilanasa. Se clonó una versión trimodular truncada de Uniprot: E1KC96 (A31-P650) y se denomina de aquí en adelante SEQ ID N.º: 7.

[0103] El proceso de optimización y la clonación de los genes sintéticos comprados se subclonaron usando los sitios de restricción ClaI y MluI en un vector de expresión de *Bacillus* como se describe en WO 12/025577. Las xilanasas se expresaron con una señal de secreción de *Bacillus clausii* (BcSP; con la siguiente secuencia de aminoácidos: MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA, originada a partir de la proteasa AprH de *B. clausii*). La BcSP sustituyó todas las señales de secreción nativas en todos los genes respectivamente.

[0104] Aguas abajo de la secuencia BcSP se introdujo una secuencia de etiqueta de afinidad para facilitar el proceso de purificación (etiqueta de polihistidina; con la siguiente secuencia de aminoácidos: HHHHHHPR para la xilanasa del metagenoma de estiércol de elefante, *Paenibacillus* sp. 18054 y *Acetivibrio cellulolyt*icus y HQHQHQHPR para la xilanasa de *Paenibacillus illinoisensis*, respectivamente). El gen que se expresó, por lo tanto, comprendía la secuencia BcSP seguida de la secuencia de la etiqueta de polihistidina seguida de la secuencia de la xilanasa de tipo salvaje madura.

[0105] Los plásmidos de expresión finales (BcSP-etiqueta de polihistidina-xilanasa) se transformaron individualmente en un huésped de expresión de *Bacillus subtilis*. Los genes de fusión de BcSP y xilanasa se integraron por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped de *Bacillus subtilis* tras la transformación.

[0106] La construcción génica se expresó bajo el control de un triple sistema promotor (como se describe en WO 99/43835). El gen que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa se usó como productor (como se describe en (Diderichsen et al., 1993, Plasmid 30: 312-315). Los transformantes se seleccionaron en medio agar LB suplementado con 6 microgramos de cloranfenicol por ml. Se seleccionó y se cultivó un clon recombinante de *Bacillus subtilis* con la respectiva construcción de expresión de xilanasa en una mesa vibratoria giratoria en matraces Erlenmeyer con deflectores de 500 ml que contenía cada uno 100 ml de medios a base de extracto de levadura. Después de 3-5 días de tiempo de cultivo de 30 ºC a 37 ºC, se recolectaron sobrenadantes que contenían enzima mediante centrifugación y las enzimas se purificaron mediante purificación de etiquetas de polihistidina.

Ejemplo 2: purificación de xilanasas GH5

[0107] Todas las enzimas marcadas con histidina se purificaron por cromatografía de metales inmovilizados (IMAC) usando Ni^{2+} como ion metálico en columnas HisTrap Excel de 5 ml (GE Healthcare Life Sciences). La

purificación se produjo a pH 8 y las proteínas unidas se eluyeron con imidazol. La pureza de las enzimas purificadas se comprobó por SDS-PAGE y la concentración de cada enzima se determinó por absorbancia a 280 nm después de un intercambio de tampón.

Ejemplo 3: medición de fibra alimentaria soluble e insoluble en el sustrato de maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) y correlación con la xilosa soluble medida después de la incubación enzimática

[0108] Se añadieron 400 mg de maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) a tampón NaOAc (5 ml, pH 5). La mezcla se calentó entre 90 y 100 ºC, luego se añadió Termamyl 300 DX (100 µl, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) y la mezcla se incubó durante 1 hora. Luego se enfrió la mezcla y se añadió amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (500 µl, número de catálogo E-AMGDF, para usar en Megazyme Total Starch y Dietary Fiber, Megazyme International Ireland, Wicklow, Irlanda) y las muestras se incubaron durante toda la noche (16 h) a 60 ºC. Luego se enfrió la mezcla y se centrifugó a 2500 x g durante 10 min a 5 ºC. El sobrenadante se recogió y se añadió tampón NaOAc (5 ml, pH 5) al residuo y se centrifugó a 2500 x g, 10 min, 5 ºC. Este procedimiento se repitió dos veces. Luego se recogieron los sobrenadantes, se agruparon y se analizaron para NSP solubles como se describe en A. El residuo se analizó para NSP insolubles como se describe en B.

A: NSP solubles, sobrenadante

[0109] Los sobrenadantes agrupados se diluyeron en un volumen fijo de donde se tomó una alícuota de 5 ml de sobrenadante. A esta alícuota se le añadieron 20,1 ml de etanol al 99,9% frío y la mezcla se mantuvo en hielo durante aprox. 15 min para la precipitación de los polímeros con un GP>10. Después de centrifugar a 2500 x g, 5 ºC durante 10 min, el sobrenadante se descartó.

[0110] se añadieron 5 ml de etanol al 80% frío al sedimento y la mezcla se mantuvo en hielo durante aprox. 15 min. Después de centrifugar a 2500 x g, 5 ºC durante 10 min, el sobrenadante se descartó.

[0111] La hidrólisis ácida del precipitado se realizó mediante la adición de agua MQ (7,9 ml), mioinositol (0,5 ml, estándar interno) y 12M H_2SO_4 (0,3 ml) y autoclavando a 125 ºC durante 55 minutos.

B: NSP insolubles, residuo

[0112] El sedimento obtenido después del tratamiento con AMG se hidrolizó mediante la adición de agua MQ (74 ml), mioinositol (10 ml, estándar interno) y 12M H_2SO_4 (3 ml) y autoclavando a 125 ºC durante 55 minutos.

Análisis por CGL

[0113] Después de autoclavar, las muestras se redujeron con borohidruro para producir azúcares alditol y estos se derivaron mediante acetilación para volverse volátiles para los análisis por CGL en un instrumento con un detector FID (Pettersson et al, (1995) "Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (the Uppsala method), Collaborative study", J. AOAC Int. 78: 1030-1044). La concentración de los azúcares solubles o insolubles se determinó con respecto al mioinositol.

Porcentaje de xilosa solubilizada

[0114] Cuando el MDGDA se incuba con enzima a 40 ºC durante 4 horas, la enzima solubiliza el xilano del sustrato y este xilano solubilizado se hidroliza después aún más con ácido. La xilosa liberada se mide espectrofotométricamente usando un kit de ensayo de D-xilosa (Megazyme, número de catálogo K-xylose). Esta xilosa (que es en realidad xilano solubilizado por enzimas) se correlaciona entonces con la cantidad de xilosa total del sustrato medida por CGL como se ha descrito anteriormente.

[0115] El MDGDA contiene un 99% de xilosa insoluble y un 1% soluble, en total un 14,81% de xilosa que representa la concentración de polímero de xilosa (GP>10) presente en la muestra (MDGDA) según el análisis. Basándose en la liberación de xilosa medida por el kit Megazyme que calcula la liberación en función del peso de muestra, la cantidad de xilosa liberada se puede calcular de la siguiente manera: por ejemplo, una liberación del 1% a partir de 400 mg de muestra equivale a 4 mg de xilosa. En 400 mg de muestra hay 400 mg x 14,81% de xilosa, igual a 59,22 mg de xilosa. La liberación bruta de xilosa (insoluble + soluble) es en ese caso 4 mg/59,22 mg, que representa una liberación de 6,75 mg de xilosa, pero debe tenerse en cuenta que este valor debe corregirse para la liberación pasiva obtenida para el control no suplementado con enzima. Este valor corregido se define en la presente como el porcentaje de xilosa solubilizada.

Ejemplo 4: hidrólisis de maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) con xilanasas GH5

[0116] El maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA, 400 mg) se añadió a una solución de acetato sódico (0,1 M, 3,9 ml) acuosa que contenía cloruro de calcio (5 mM) a pH 5 y la mezcla se calentó a 40 ºC durante 30 minutos. Se añadieron 100 µl de solución de tampón o de enzima y la muestra se calentó a 40 ºC durante 4 horas. La muestra se enfrió a 5 ºC y se centrifugó (4000 rpm, 5 ºC) durante 10 minutos. Se transfirieron 1,7 ml de la muestra a un tubo Eppendorf y la enzima se desactivó calentando a 95 ºC durante 10 minutos. Las muestras se congelaron luego hasta que se hidrolizaron.

[0117] El sobrenadante se descongeló y se centrifugó (14000 rpm) durante 5 minutos. El sobrenadante (250 µl) se diluyó con agua MilliQ (250 µl) en tubos de vidrio y se añadió HCl (1,63 M, 2,0 ml). La reacción se calentó a 100 ºC durante 1 hora y luego se enfrió en un baño de hielo. Se añadió solución acuosa de NaOH (1,3 M, 2,5 ml) mientras las muestras se enfriaban en hielo y las muestras se almacenaron a 0-5 ºC mientras el contenido de xilosa se analizaba usando el ensayo de xilosa. Los resultados se presentan en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2: liberación de xilosa a partir de MDGDA usando xilanasa GH5 de SEQ ID N.º: 2

La tabla 2 muestra la cantidad de xilosa medida después de la hidrólisis ácida de los sobrenadantes (% de materia seca y % de xilosa solubilizada de la xilosa total) cuando se incuba maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) con la xilanasa GH5 de SEQ ID N.º: 2 a diferentes concentraciones de enzima en comparación con el blanco y la xilanasa comercial GH11 Ronoxyme WX.

Xilanasa GH5	Conc. [mg EP/kg]	Xilosa soluble (%)	% de xilosa solubilizada[1]	Significación[2]	Desv. Est.
Blanco	0	0,039	0,3	C	0,004
Ronozyme WX (GH11)	25	0,101	0,7	C	0,009
SEQ ID N.º: 2	10	0,903	6,2	B	0,116
SEQ ID N.º: 2	25	1,295	9,0	A	0,225
SEQ ID N.º: 2	50	1,200	8,2	A	0,133

[1]El porcentaje de xilosa solubilizada se calculó como se describe en el ejemplo 3.
[2]ABC: los valores de mínimos cuadrados dentro de una columna que no comparten una letra mayúscula difieren significativamente (P<0,05 Tukey-Kramer HSD para todos los pares).

Tabla 3: liberación de xilosa de MDGDA usando xilanasa GH5 de SEQ ID N.º: 4

La tabla 3 muestra la cantidad de xilosa medida después de la hidrólisis ácida de sobrenadantes (% de materia seca y % de xilosa solubilizada de la xilosa total) cuando se incuba maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) con la xilanasa GH5 de SEQ ID N.º: 4 a diferentes concentraciones de enzima en comparación con el blanco y la xilanasa GH11 comercial Ronoxyme WX.

Xilanasa GH5	Conc. [mg EP/kg]	Xilosa soluble (%)	% de xilosa solubilizada[1]	Significación[2]	Desv. Est.
Blanco	0	0,040	0,3	C	0,001
Ronozyme WX (GH11)	25	0,101	0,7	C	0,010
SEQ ID N.º: 4	10	0,890	5,9	B	0,018
SEQ ID N.º: 4	25	1,016	7,0	B	0,078
SEQ ID N.º: 4	50	1,340	9,2	A	0,280

[1]El porcentaje de xilosa solubilizada se calculó como se describe en el ejemplo 3.
[2]ABC: los valores de mínimos cuadrados dentro de una columna que no comparten una letra mayúscula difieren significativamente (P<0,05 Tukey-Kramer HSD para todos los pares).

Tabla 4: liberación de xilosa de MDGDA usando xilanasa GH5 de SEQ ID N.º: 18

La tabla 4 muestra la cantidad de xilosa medida después de la hidrólisis ácida de sobrenadantes (% de materia seca y % de xilosa solubilizada de la xilosa total) cuando se incuba maíz desgrasado desalmidonado (MDGDA) con la xilanasa GH5 de SEQ ID N.º: 6 a diferentes concentraciones de enzima en comparación con el blanco y la xilanasa GH11 comercial Ronoxyme WX.

Xilanasa GH5	Conc. [mg EP/kg]	Xilosa soluble (%)	% de xilosa solubilizada[1]	Significación[2]	Desv. Est.
Blanco	0	0,001	0,0004	C	0,001
Ronozyme WX (GH11)	25	0,053	0,04	C	0,009
SEQ ID N.º: 6	10	0,934	6,4	B	0,154

[1]El porcentaje de xilosa solubilizada se calculó como se describe en el ejemplo 3.

[2]ABC: los valores de mínimos cuadrados dentro de una columna que no comparten una letra mayúscula difieren significativamente (P<0,05 Tukey-Kramer HSD para todos los pares).

[0118] Como se puede observar en las tablas 2, 3 y 4, las xilanasas GH5 son significativamente mejores en la liberación de xilosa de maíz desgrasado desalmidonado que cualquier blanco de la xilanasa GH11 comercial Ronoxyme WX.

Ejemplo 5: preparación enzimática de hidrolizados de goma de fibra de maíz

[0119] Las enzimas purificadas usadas para la hidrólisis fueron SEQ ID Nº: 2, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 8 (GH5_34 pentamodular de *Clostridium thermocellum* NzyTech (número de catálogo (SKU): CR0061, Correia et al. J. Biol. Chem. 2011, 286: 22510-22520)), Pentopan mono, Pulpzyme y Shearzyme. Para los productos comerciales, la xilanasa principal fue producto purificado por cromatografía de intercambio aniónico y se evaluó.

[0120] Todas las reacciones se realizaron con CFG1 con un 3,1% de MS como concentración final. El ensayo también contenía 45 mM de tampón MES a pH 6 y las concentraciones de enzima finales evaluadas fueron: 41, 18, 7,3, y 1,8 mg/l durante 2 horas y 41 mg/l durante 24 h a 40 ºC para la mayoría de las enzimas. La SEQ ID N.º: 7 se evaluó a 30 ºC debido a una baja termoestabilidad. Todas las reacciones se detuvieron a 95 ºC durante 10 min y se analizaron por HPLC-SEC en un ICS-3000 con detección RI (Dionex). Las columnas usadas fueron una precolumna PWXL y una PWXL-3000 y -5000 (Tosoh) conectadas en serie. El eluyente fue 50 mM de NaOAc a pH 5 y el caudal 0,5 ml/min. Los tiempos de retención se compararon con un estándar de peso molecular de pululano entre 803-1,3 kDa y glucosa, maltotriosa y maltopentosa.

Resultados

[0121] En las siguientes tablas se proporcionan las características de la goma de fibra de maíz y los respectivos productos producidos por tratamiento enzimático.

Tabla 5. Características de la goma de fibra de maíz solubilizada con álcali.

Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
227492	129701	302344	2,3

Tabla 6. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la actividad principal de la xilanasa GH11 en Pentopan Mono™. Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
1,8	2	228839	124375	290617	2,34
7,3	2	184165	117007	263390	2,25
18	2	162696	117212	257179	2,19
41	2	205511	113496	254255	2,24
41	24	209217	115376	243574	2,11

Tabla 7. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la actividad principal de la xilanasa GH11 en Pulpzyme™. Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
1,8	2	217344	126520	285321	2,26

7,3	2	207962	124297	265849	2,14
18	2	189005	117782	249998	2,12
41	2	193856	119805	251758	2,10
41	24	211270	115520	245405	2,12

Tabla 8. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la actividad principal de la xilanasa GH10 en Shearzyme™ 500 L. Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
1,8	2	212907	105298	246478	2,34
7,3	2	208994	84282	221618	2,63
18	2	197932	74413	205479	2,76
41	2	194088	69845	197069	2,82
41	24	174418	44927	160978	3,58

Tabla 9. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la xilanasa de la familia GH5_35 de SEQ ID N.º: 2. Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
1,8	2	166060	20266	132629	6,54
7,3	2	63011	13211	70669	5,35
18	2	38557	9821	46983	4,78
41	2	21607	8057	35598	4,42
41	24	8701	6348	24976	3,92

Tabla 10. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la xilanasa de la familia GH5_35 de SEQ ID N.º: 4. Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
1,8	2	172666	22324	145242	6,51
7,3	2	63280	12591	70743	5,62
18	2	39090	9358	47688	5,1
41	2	20815	7618	35496	4,66
41	24	8837	5722	22324	3,9

Tabla 11. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la xilanasa de la familia GH5_21 de SEQ ID N.º: 6. Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
1,8	2	8228	8368	28884	3,45
7,3	2	4937	4709	14995	3,18
18	2	4735	4007	12885	3,22
41	2	2318	3645	10920	3,00
41	24	2268	2864	8559	2,99

Tabla 12. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la xilanasa de la familia GH5_34 de SEQ ID N.º: 7. Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad

1,8	2	193478	74799	234258	3,13
7,3	2	82734	24762	137377	5,55
18	2	47096	14798	78416	5,30
41	2	16107	8499	41935	4,93
41	24	4541	4390	16530	3,77

Tabla 13. Características de los hidrolizados de goma de fibra de maíz producidos usando la arabinoxilanasa pentamodular de la familia GH5_34 de SEQ ID N.º: 8 (disponible de NzyTech). Los cálculos están basados en la fracción por encima de GP2.

Conc. de enzima (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Mp (Da)	Mn (Da)	Mw (Da)	Polidispersidad
1,8	2	137128	54827	229844	4,19
7,3	2	77794	31050	153021	4,93
18	2	38688	11646	83398	7,16
41	2	8894	7192	38017	5,29
41	24	2533	2703	10810	4,00

[0122] Los datos de los hidrolizados de goma de fibra de maíz mostraron claramente que todas las xilanasas GH5 evaluadas de las subfamilias GH5_21, GH5_34 y GH5_35 tienen la capacidad de degradar este xilano altamente sustituido. La fracción GP1-GP2 estaba por debajo del 1% bajo todas las condiciones evaluadas.

[0123] Los dos xilanasas de la familia GH11 evaluadas no degradaron el xilano en absoluto, mientras que la xilanasa GH10 presente en Shearzyme 500 L solo tuvo una capacidad de degradación de goma de fibra de maíz moderada.

[0124] En base a los resultados anteriores, se evaluaron los efectos de añadir xilanasas GH5 en un proceso de almidón a etanol.

Ejemplo 6: mejora del rendimiento de etanol usando una xilanasa GH5_35 y GH5_21 añadida en la sacarificación/fermentación

[0125] La licuefacción de un mosto de maíz molido se realizó a 85 ºC usando una alfa-amilasa comercial, Liquozyme™ SCDS (disponible de Novozymes A/S) según la tabla a continuación.

Mosto	Enzima(s)/ kg/ t DS	T (ºC)	Tiempo (min)	DS (%)	pH	Mezcla (rpm)	Calcio (ppm)
	Maíz: 0,3 kg SCDS/ t DS	85	120	28	5,5	80 después de 20 min a 300	30

[0126] El mosto licuado se dividió en tres partes y se realizó la sacarificación y la fermentación simultáneas según la tabla a continuación. Un producto de glucoamilasa comercial, Spirizyme Excel™ (disponible de Novozymes A/S) se usó para la sacarificación y la levadura fue Ethanol Red™ (disponible de Lallemand). La fermentación fue seguida por una pérdida de peso medida dos veces al día y por HPLC al final de la fermentación. La muestra de control solo contenía las enzimas glucoamilasas. Además, una muestra contenía glucoamilasa y la xilanasa GH5_35 (U2AGD/SEQ ID N.º: 4) y otra muestra contenía glucoamilasa y la xilanasa GH5_21 (U2C9W/SEQ ID N.º: 6). El rendimiento de etanol se muestra en la figura 1 y demuestra que la adición de una xilanasa GH5 aumentó el rendimiento de etanol en comparación con el control. En particular la xilanasa GH5_35 resultó en un aumento de alrededor del 2%.

Muestra	Enzima(s)	T (ºC)	Tiempo (horas)	pH	Levadura (mill/ml)
Control	0,55 kg Spirizyme Excel/ t DS	32	96	4,5	30
GH5_35	0,55 kg Spirizyme Excel/ t DS + 50 µg SEQ ID N.º: 4 / g DS	32	96	4,5	30
GH5_21	0,55 kg Spirizyme Excel/ t DS + 50 µg SEQ ID	32	96	4,5	30

	N.º: 6 / g DS				

LISTADO DE SECUENCIAS

[0127]

<110> Novozymes A/S

<120> Proceso para producir etanol a partir de almidón usando una xilanasa GH5

<130> 12986-WO-PCT

<160> 8

<170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1
<211> 1722
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen con optimización de codones que codifica una xilanasa GH5_35 de Paenibacillus illinoisensis

<400> 1

```
atgaagaaac cgttggggaa aattgtcgca agcaccgcac tactcatttc tgttgctttt      60

agttcatcga tcgcatcggc tcatcagcac caacaccagc atcctaggtg ggttggcatg     120

ccgatgggca aactgcatgt ttcaggcaaa aatctggtca atagcaataa tcaaccggtt     180

ctgctgaatg gctggcatca accgtcaggc gcatattgga catatcaatc atcaaactat     240

tatctgaatc tgcatggaaa taatcgccat gcggcaacac tggcatatct gaaagatatc     300

acagatacat ttgcagacac gtcaccgaaa tatggctcaa atcatggctg gaatatgaat     360

caggtccgcc tgtttattga tcgcgaagat atgggagatg ttgcagcagg cacatataac     420

tttgcaggcg ttcaaacagt tacacagaat gtcattattc cgtatatcca gtatgcgaaa     480

acgaaaggcg tttatgttgt tctgggcctg gattttacac tgaaagatga tcaagcaaca     540

acagcgagca atctgcagaa atttaaccaa atttggggct atctggcatc aagaccggaa     600

atcaaatcag cagataacgt ccattttgaa ctgattaacg aaccggttaa aagctatgca     660

aatggccatt ggggaggcta taatggcgaa aatgattttg tcgatcattg gaatgatctg     720

cgcaattttc agaacagcat tatttcaaca attcgctcac aaggcgcaga taatgttatt     780

tgggcagcag gcctgggcta taatcagttt tattcactga cagcatcaca tccgctgaca     840

gatccgctga ataactatgg ctatgcagtt cattggtatc cgggatatgg cgcatatgat     900

aactttagca ttctgcagga tcagtggaac acaaatgtta aagcagcagc agataaatat     960
```

ccgattaaca tcacggaagt cacatggttt aaaaacaaac ctggcgattc agcatactgg 1020

aatcttttta atggcagcaa tgaaggcttt ggcacaaaca caaaaacgat ctttaatgca 1080

gcaggcaatg ttagcattgc agcacatatg aatggcttta ttctggaacc gggacaaaga 1140

tcatcatttg cagatccgac agcaggcctg aaatgggatg gcgacgcatc aagatcagca 1200

atgggcagat ttctgtttaa ttggtatcat gaaagagcgc aatcatatcc tggcggaaat 1260

ggcggaggac cgacaacagg cctggtttca ggcgcaacat acaaaattgt tgcacgccat 1320

agcaacaaag tcattgatgt ccctggcgga caaaatcaaa acaatctgca actgcaacag 1380

tggtcagatc tgggaggcaa tccgcaaaaa tgggttctga catcaattgg cggaggctca 1440

tatacactga catcagttaa ttcaccggac aaagtgattg atattcgcaa tggcacactg 1500

acaaatggcg aagcagttca actgatgtca aatctgaata caacagcgca gcattttaaa 1560

gtcaatgatc tgggcaatgg ctattggagc attattaacg tcaacagcaa caaagcgatc 1620

gaagttgaaa atgcatcaac atcagatggc gcaaaactgc agcaaaatac atatacaggc 1680

gcaacaaatc agcagtggaa atttatcgca gtcagcaatt aa 1722

<210> 2
<211> 573
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Xilanasa GH5_35 de Paenibacillus illinoisensis que incluye un péptido señal de Bacillus clausii y una etiqueta de polihistidina

<400> 2

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala His Gln His Gln His
20 25 30

Gln His Pro Arg Trp Val Gly Met Pro Met Gly Lys Leu His Val Ser
35 40 45

Gly Lys Asn Leu Val Asn Ser Asn Asn Gln Pro Val Leu Leu Asn Gly
50 55 60

Trp His Gln Pro Ser Gly Ala Tyr Trp Thr Tyr Gln Ser Ser Asn Tyr
65 70 75 80

Tyr Leu Asn Leu His Gly Asn Asn Arg His Ala Ala Thr Leu Ala Tyr
85 90 95

Leu Lys Asp Ile Thr Asp Thr Phe Ala Asp Thr Ser Pro Lys Tyr Gly
100 105 110

Ser Asn His Gly Trp Asn Met Asn Gln Val Arg Leu Phe Ile Asp Arg
115 120 125

Glu Asp Met Gly Asp Val Ala Ala Gly Thr Tyr Asn Phe Ala Gly Val
130 135 140

Gln Thr Val Thr Gln Asn Val Ile Ile Pro Tyr Ile Gln Tyr Ala Lys
145 150 155 160

Thr Lys Gly Val Tyr Val Val Leu Gly Leu Asp Phe Thr Leu Lys Asp
165 170 175

Asp Gln Ala Thr Thr Ala Ser Asn Leu Gln Lys Phe Asn Gln Ile Trp
180 185 190

Gly Tyr Leu Ala Ser Arg Pro Glu Ile Lys Ser Ala Asp Asn Val His
195 200 205

Phe Glu Leu Ile Asn Glu Pro Val Lys Ser Tyr Ala Asn Gly His Trp
210 215 220

Gly Gly Tyr Asn Gly Glu Asn Asp Phe Val Asp His Trp Asn Asp Leu
225 230 235 240

Arg Asn Phe Gln Asn Ser Ile Ile Ser Thr Ile Arg Ser Gln Gly Ala
245 250 255

Asp Asn Val Ile Trp Ala Ala Gly Leu Gly Tyr Asn Gln Phe Tyr Ser
260 265 270

Leu Thr Ala Ser His Pro Leu Thr Asp Pro Leu Asn Asn Tyr Gly Tyr
275 280 285

Ala Val His Trp Tyr Pro Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Asn Phe Ser Ile
290 295 300

Leu Gln Asp Gln Trp Asn Thr Asn Val Lys Ala Ala Ala Asp Lys Tyr
305 310 315 320

Pro Ile Asn Ile Thr Glu Val Thr Trp Phe Lys Asn Lys Pro Gly Asp
325 330 335

Ser Ala Tyr Trp Asn Leu Phe Asn Gly Ser Asn Glu Gly Phe Gly Thr
340 345 350

Asn Thr Lys Thr Ile Phe Asn Ala Ala Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala
355 360 365

His Met Asn Gly Phe Ile Leu Glu Pro Gly Gln Arg Ser Ser Phe Ala
370 375 380

Asp Pro Thr Ala Gly Leu Lys Trp Asp Gly Asp Ala Ser Arg Ser Ala
385 390 395 400

Met Gly Arg Phe Leu Phe Asn Trp Tyr His Glu Arg Ala Gln Ser Tyr
405 410 415

Pro Gly Gly Asn Gly Gly Gly Pro Thr Thr Gly Leu Val Ser Gly Ala
420 425 430

Thr Tyr Lys Ile Val Ala Arg His Ser Asn Lys Val Ile Asp Val Pro
435 440 445

Gly Gly Gln Asn Gln Asn Asn Leu Gln Leu Gln Gln Trp Ser Asp Leu
450 455 460

Gly Gly Asn Pro Gln Lys Trp Val Leu Thr Ser Ile Gly Gly Gly Ser
465 470 475 480

Tyr Thr Leu Thr Ser Val Asn Ser Pro Asp Lys Val Ile Asp Ile Arg
485 490 495

Asn Gly Thr Leu Thr Asn Gly Glu Ala Val Gln Leu Met Ser Asn Leu
500 505 510

Asn Thr Thr Ala Gln His Phe Lys Val Asn Asp Leu Gly Asn Gly Tyr
515 520 525

Trp Ser Ile Ile Asn Val Asn Ser Asn Lys Ala Ile Glu Val Glu Asn
530 535 540

Ala Ser Thr Ser Asp Gly Ala Lys Leu Gln Gln Asn Thr Tyr Thr Gly
545 550 555 560

Ala Thr Asn Gln Gln Trp Lys Phe Ile Ala Val Ser Asn
565 570

<210> 3
<211> 1749
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen con optimización de codones que codifica una xilanasa GH5_35 de Paenibacillus sp 18054

<400> 3

```
atgaagaaac cgttggggaa aattgtcgca agcaccgcac tactcatttc tgttgctttt      60
agttcatcga tagcatcagc acatcatcat caccatcatc ctaggttgac ggttccgccc     120
ggcgccccgg ccgaggcttg gtctggcatg cctacgccca agcttcatgt cagcggcaac     180
caactggtaa atgcaaacgg acagcctgtc ctgctaagcg ggtggcatca gccttccggg     240
tcctactgga cgtatcagag cagcagttac tacctggacc gtaacggcgg aaaccggcat     300
gccgccaacc tggcgtatct caaggatatc acagacacct ttacggacac ctcgcccaaa     360
tacgggaaca accacggctg gtatatgaat caggttcggc tattcattga tcgcgaggat     420
atgggggatg tcgccgaagg cacttacaac tttgctggat tgcaggcggt tacgcaaaat     480
gtgattattc cgtacattaa ttatgcgaga acaaaagggc tttatgtgac gctcggactg     540
gattttacgc tcaaagacaa tcaggcgacc acacaggcca atttggacaa gttcaatcag     600
atttggagtt atctagcatc cagaccggaa ataagaagcg ctgacaacgt catgtttgaa     660
attattaacg agccggtatt gtcgtatgcg gacggcagat ggggcggtca tccgtccgac     720
cctcatttta tagcattctg gaacgatttg cgcagttttc aaaactctat catctcctcc     780
attcgcgcac aaggagcgga taatgtgatc tgggcggccg ggctcggctg ggatcagtac     840
taccagttgt gtgcgtcgca tcctctgacg gacccgctca ataatgtagg ttatgcggtt     900
cactggtatc cgggatatgg agcaggggat aactattcgg tgcttcagca acaatgggat     960
acgaatatta agccatgcgc cgacaactat ccgatcaata taacggaaac gacctggttc    1020
aagcgactgc ctggcgattc ggattactgg aatttgttca atggctcgag cgagggcttc    1080
ggcaaaaata cgaaagcaat ctttactgcg gcgggcaatg ccagcattgc cgtccatatg    1140
aacggctttt tattggcgcc gggagcaaga agctcatttg ccgatccgac tgccggtctg    1200
ttatacgacg gaaatacagc tcgagacggc atggcccgct ttatattcga gtggtattac    1260
gaaagagcgc agttcttgcc gtggaatggc atttggaacg gactgttcac aggatcgacc    1320
tacaagttcg tgaatcgggc aaccggcaaa aatatggatg tgccgggcgg acaaaacaat    1380
aataatctgc aattgaacca atggacggat aatggagcaa cggcgcagcg ctgggtcgta    1440
gacgatatgg gcactttcaa caatatatat cgcatgaaga gcgtcagctc atcggacggc    1500
```

aaggtaatgg atgtccgcaa cggcaccaaa aacaatggag aagccattca gcttatgcag 1560

gacttctcga acacggcgca gcgtttccgg attattcgac ttagcaacgg ctattggagc 1620

attattaatg tcaacagcaa caaagcggtt gaggtcgccg gcggcgcttc tcatgacgga 1680

gcgctattgc aacagaacat gtatcgcgga gatcatcatc aacagtggca gctggttcag 1740

attcaataa 1749

<210> 4
<211> 582
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Xilanasa GH5_35 de Paenibacillus sp. que incluye un péptido señal de Bacillus clausii y una etiqueta de polihistidina

<400> 4

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala His His His His His
20 25 30

His Pro Arg Leu Thr Val Pro Pro Gly Ala Pro Ala Glu Ala Trp Ser
35 40 45

Gly Met Pro Thr Pro Lys Leu His Val Ser Gly Asn Gln Leu Val Asn
50 55 60

Ala Asn Gly Gln Pro Val Leu Leu Ser Gly Trp His Gln Pro Ser Gly
65 70 75 80

Ser Tyr Trp Thr Tyr Gln Ser Ser Ser Tyr Tyr Leu Asp Arg Asn Gly
85 90 95

Gly Asn Arg His Ala Ala Asn Leu Ala Tyr Leu Lys Asp Ile Thr Asp
100 105 110

Thr Phe Thr Asp Thr Ser Pro Lys Tyr Gly Asn Asn His Gly Trp Tyr
115 120 125

Met Asn Gln Val Arg Leu Phe Ile Asp Arg Glu Asp Met Gly Asp Val
130 135 140

Ala Glu Gly Thr Tyr Asn Phe Ala Gly Leu Gln Ala Val Thr Gln Asn
145 150 155 160

Val Ile Ile Pro Tyr Ile Asn Tyr Ala Arg Thr Lys Gly Leu Tyr Val
165 170 175

Thr Leu Gly Leu Asp Phe Thr Leu Lys Asp Asn Gln Ala Thr Thr Gln
180 185 190

Ala Asn Leu Asp Lys Phe Asn Gln Ile Trp Ser Tyr Leu Ala Ser Arg
195 200 205

Pro Glu Ile Arg Ser Ala Asp Asn Val Met Phe Glu Ile Ile Asn Glu
210 215 220

Pro Val Leu Ser Tyr Ala Asp Gly Arg Trp Gly Gly His Pro Ser Asp
225 230 235 240

Pro His Phe Ile Ala Phe Trp Asn Asp Leu Arg Ser Phe Gln Asn Ser
245 250 255

Ile Ile Ser Ser Ile Arg Ala Gln Gly Ala Asp Asn Val Ile Trp Ala
260 265 270

Ala Gly Leu Gly Trp Asp Gln Tyr Tyr Gln Leu Cys Ala Ser His Pro
275 280 285

Leu Thr Asp Pro Leu Asn Asn Val Gly Tyr Ala Val His Trp Tyr Pro
290 295 300

Gly Tyr Gly Ala Gly Asp Asn Tyr Ser Val Leu Gln Gln Gln Trp Asp
305 310 315 320

Thr Asn Ile Lys Pro Cys Ala Asp Asn Tyr Pro Ile Asn Ile Thr Glu
325 330 335

Thr Thr Trp Phe Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ser Asp Tyr Trp Asn Leu
340 345 350

Phe Asn Gly Ser Ser Glu Gly Phe Gly Lys Asn Thr Lys Ala Ile Phe
355 360 365

Thr Ala Ala Gly Asn Ala Ser Ile Ala Val His Met Asn Gly Phe Leu
370 375 380

Leu Ala Pro Gly Ala Arg Ser Ser Phe Ala Asp Pro Thr Ala Gly Leu
385 390 395 400

Leu Tyr Asp Gly Asn Thr Ala Arg Asp Gly Met Ala Arg Phe Ile Phe
405 410 415

Glu Trp Tyr Tyr Glu Arg Ala Gln Phe Leu Pro Trp Asn Gly Ile Trp
420 425 430

Asn Gly Leu Phe Thr Gly Ser Thr Tyr Lys Phe Val Asn Arg Ala Thr
435 440 445

Gly Lys Asn Met Asp Val Pro Gly Gly Gln Asn Asn Asn Asn Leu Gln
450 455 460

Leu Asn Gln Trp Thr Asp Asn Gly Ala Thr Ala Gln Arg Trp Val Val
465 470 475 480

Asp Asp Met Gly Thr Phe Asn Asn Ile Tyr Arg Met Lys Ser Val Ser
485 490 495

Ser Ser Asp Gly Lys Val Met Asp Val Arg Asn Gly Thr Lys Asn Asn
500 505 510

Gly Glu Ala Ile Gln Leu Met Gln Asp Phe Ser Asn Thr Ala Gln Arg
515 520 525

Phe Arg Ile Ile Arg Leu Ser Asn Gly Tyr Trp Ser Ile Ile Asn Val
530 535 540

Asn Ser Asn Lys Ala Val Glu Val Ala Gly Gly Ala Ser His Asp Gly
545 550 555 560

Ala Leu Leu Gln Gln Asn Met Tyr Arg Gly Asp His His Gln Gln Trp
565 570 575

Gln Leu Val Gln Ile Gln
580

<210> 5
<211> 1902
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen con optimización de codones que codifica una xilanasa GH5_21 de un organismo desconocido

<400> 5

atgaagaaac cgttggggaa aattgtcgca agcaccgcac tactcatttc tgttgctttt 60

agttcatcga tagcatcagc acatcatcat caccatcatc ctaggtggcg tggcatgaga 120
atgccggaac tgtttatcaa aggcagatat ctgatggcga aagatatgaa tggcaacgat 180
agcattgtta atctgcatgg ctttggccaa acatatagcg cgtattttaa cggctatgcg 240
tggtgcaaaa atccggatgg ctcagttaat tggggcaaaa caaaagatgc agcagcatgc 300
gttaaatgga ataaagaaca aattggcctg atgctggatc atggctggaa agttaattgg 360
ctgagactgc atatggatcc ggcatggtca aataatgaaa caaaagtcaa tcaatggcag 420
agccaacatc cgggaacata ttattcagaa aatctgatcg tcgcgtttga tatgaacctg 480
tttaaaaaat atctggatga aatctttatt ccgatggcgg aatatgcgat tgaaaacggc 540
atttatgttg ttatgcgtcc gcctggcgtt tgtccgcaaa aactgacagt tggagatgaa 600
tatcagcagt acctgattaa agtctggaca tatgtttgca gccatgaaaa actgaaaaac 660
aatccgtata ttatgtttga actggcgaac gaaccgatcg atatgaatga tggcaatggc 720
aattatacgt catggtcaga tggctcacag aaaaactgca cgaaattttt tcagaaaatt 780
gtcgacgaaa ttagagcagt cggctgcaat aacattctgt gggttccggg actggcatat 840
caacaaaatt atcaaggcta tgtcaaatac ccgattgtcg gcgaaaatat tggctttgca 900
gttcattgct atccgggatg gtatggctca gattcagaag ttgcatcagc agaacaacaa 960
attgtcacaa acggcaatac gtatgcggat tttcaatcag gctggtcagc aagcattgat 1020
ggcgtttcaa aacttagacc gattatcgtc acagaaatgg attgggcacc gaaaaaatac 1080
aattcatcat ggggcaaagc aacgacaggc aaactgggag gcgttggctt tggcaataac 1140
tttaaataca tcatggacaa aacaggcaac gttagctgga tgctgtttac agatgcagat 1200
aaactggcga aatatgatga ttcaaaagca gatggcagca cgtttctgac agatccggaa 1260
gcatgcccta gaccggttta tagatggtat aaagaatatg cagaaccggg atggaaattt 1320
gttgaaacac tggcagatga attttacatg tttccgggaa caaacagcat ttttagcccg 1380
aacatttggg aaaaaggcac actgacaaaa aatgatgatg gctcaagaac actggtcaca 1440
ggccaatatg gctttggagg ctggaaattt ggcggaggcc tggatatgtc aggctataaa 1500
tacctggttc tgaacctgac aaaagcaccg gcatcaaatc aatggtcact gagactgttt 1560
gatgtcgata actattggac agacccgtat atgaaagatg tcaaatcaag cacaagagtc 1620
gttgtcgatc tgcagaatat gaaaaatagc aaaggcgtta aagtcgaccc gagccatatc 1680
tatattctgg gcctgtggtc aacaggcgga acaccgatta caattaaaga tatctatctg 1740
acaaataata gcgattattc accggaatca acaggcattt cagaaacact tgcagaaaaa 1800
agactggaca caccgattta taacctgtca ggccaaagag ttacagaacc gagaaatggc 1860

catgtctata ttcgcaacgg caaaaaattc atttacaaat aa 1902

<210> 6
<211> 633
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Xilanasa GH5_21 que incluye un péptido señal de Bacillus clausii y una etiqueta de polihistidina

<400> 6

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala His His His His His
20 25 30

His Pro Arg Trp Arg Gly Met Arg Met Pro Glu Leu Phe Ile Lys Gly
35 40 45

Arg Tyr Leu Met Ala Lys Asp Met Asn Gly Asn Asp Ser Ile Val Asn
50 55 60

Leu His Gly Phe Gly Gln Thr Tyr Ser Ala Tyr Phe Asn Gly Tyr Ala
65 70 75 80

Trp Cys Lys Asn Pro Asp Gly Ser Val Asn Trp Gly Lys Thr Lys Asp
85 90 95

Ala Ala Ala Cys Val Lys Trp Asn Lys Glu Gln Ile Gly Leu Met Leu
100 105 110

Asp His Gly Trp Lys Val Asn Trp Leu Arg Leu His Met Asp Pro Ala
115 120 125

Trp Ser Asn Asn Glu Thr Lys Val Asn Gln Trp Gln Ser Gln His Pro
130 135 140

Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu Asn Leu Ile Val Ala Phe Asp Met Asn Leu
145 150 155 160

Phe Lys Lys Tyr Leu Asp Glu Ile Phe Ile Pro Met Ala Glu Tyr Ala
165 170 175

Ile Glu Asn Gly Ile Tyr Val Val Met Arg Pro Pro Gly Val Cys Pro
180 185 190

Gln Lys Leu Thr Val Gly Asp Glu Tyr Gln Gln Tyr Leu Ile Lys Val
195 200 205

Trp Thr Tyr Val Cys Ser His Glu Lys Leu Lys Asn Asn Pro Tyr Ile
210 215 220

Met Phe Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ile Asp Met Asn Asp Gly Asn Gly
225 230 235 240

Asn Tyr Thr Ser Trp Ser Asp Gly Ser Gln Lys Asn Cys Thr Lys Phe
245 250 255

Phe Gln Lys Ile Val Asp Glu Ile Arg Ala Val Gly Cys Asn Asn Ile
260 265 270

Leu Trp Val Pro Gly Leu Ala Tyr Gln Gln Asn Tyr Gln Gly Tyr Val
275 280 285

Lys Tyr Pro Ile Val Gly Glu Asn Ile Gly Phe Ala Val His Cys Tyr
290 295 300

Pro Gly Trp Tyr Gly Ser Asp Ser Glu Val Ala Ser Ala Glu Gln Gln
305 310 315 320

Ile Val Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Ala Asp Phe Gln Ser Gly Trp Ser
325 330 335

Ala Ser Ile Asp Gly Val Ser Lys Leu Arg Pro Ile Ile Val Thr Glu
340 345 350

Met Asp Trp Ala Pro Lys Lys Tyr Asn Ser Ser Trp Gly Lys Ala Thr
355 360 365

Thr Gly Lys Leu Gly Gly Val Gly Phe Gly Asn Asn Phe Lys Tyr Ile
370 375 380

Met Asp Lys Thr Gly Asn Val Ser Trp Met Leu Phe Thr Asp Ala Asp
385 390 395 400

Lys Leu Ala Lys Tyr Asp Asp Ser Lys Ala Asp Gly Ser Thr Phe Leu
405 410 415

Thr Asp Pro Glu Ala Cys Pro Arg Pro Val Tyr Arg Trp Tyr Lys Glu
420 425 430

Tyr Ala Glu Pro Gly Trp Lys Phe Val Glu Thr Leu Ala Asp Glu Phe
435 440 445

Tyr Met Phe Pro Gly Thr Asn Ser Ile Phe Ser Pro Asn Ile Trp Glu
450 455 460

Lys Gly Thr Leu Thr Lys Asn Asp Asp Gly Ser Arg Thr Leu Val Thr
465 470 475 480

Gly Gln Tyr Gly Phe Gly Gly Trp Lys Phe Gly Gly Gly Leu Asp Met
485 490 495

Ser Gly Tyr Lys Tyr Leu Val Leu Asn Leu Thr Lys Ala Pro Ala Ser
500 505 510

Asn Gln Trp Ser Leu Arg Leu Phe Asp Val Asp Asn Tyr Trp Thr Asp
515 520 525

Pro Tyr Met Lys Asp Val Lys Ser Ser Thr Arg Val Val Val Asp Leu
530 535 540

Gln Asn Met Lys Asn Ser Lys Gly Val Lys Val Asp Pro Ser His Ile
545 550 555 560

Tyr Ile Leu Gly Leu Trp Ser Thr Gly Gly Thr Pro Ile Thr Ile Lys
565 570 575

Asp Ile Tyr Leu Thr Asn Asn Ser Asp Tyr Ser Pro Glu Ser Thr Gly
580 585 590

Ile Ser Glu Thr Leu Ala Glu Lys Arg Leu Asp Thr Pro Ile Tyr Asn
595 600 605

Leu Ser Gly Gln Arg Val Thr Glu Pro Arg Asn Gly His Val Tyr Ile
610 615 620

Arg Asn Gly Lys Lys Phe Ile Tyr Lys
625 630

<210> 7
<211> 620
<212> PRT
<213> Acetivibrio cellulyticus

<400> 7

Ala Asp Pro Gln Arg Gly Arg Pro Tyr Leu Asn Ser Ala Arg Thr Thr

1 5 10 15

Phe Val Gly Asp Asn Gly Gln Pro Leu Arg Gly Pro Tyr Ile Ser Thr
20 25 30

Glu Trp Thr Ser Ala Ala Pro Tyr Asp Gln Ile Ala Arg Ile Lys Asn
35 40 45

Leu Gly Phe Asn Ala Val His His Tyr Ala Glu Cys Phe Asp Ile Asn
50 55 60

Tyr Pro Asn Ala Gly Ser Lys Ser Pro Gly Tyr Ala Ala Thr Glu Ile
65 70 75 80

Asp Lys Val Val Glu Arg Thr Arg Glu Leu Gly Leu Tyr Leu Val Met
85 90 95

Thr Ile Gly Asn Gly Ala Asn Asn Gly Asn His Asn Thr Arg Tyr Ala
100 105 110

Lys Asp Phe Trp Ser Phe Tyr Ser Ser Arg Tyr Ala Asn Glu Thr His
115 120 125

Val Leu Tyr Glu Ile His Asn Glu Pro Val Ala Trp Gly Pro Pro Tyr
130 135 140

Ser Ser Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ala Val Glu Met Asn Val Asp
145 150 155 160

Val Tyr Lys Thr Ile Arg Ala Asn Ala Pro Lys Thr Pro Val Leu Ile
165 170 175

Phe Ser Tyr Ser Val Phe Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Glu Ala Leu
180 185 190

Lys Asp Ile Gln Ala Phe Asn Ser Ala Val Phe Gly Lys Gln Asp Ala
195 200 205

Val Trp Thr Asn Glu Ala Val Ala Phe His Gly Tyr Ala Gly Trp Glu
210 215 220

Ala Thr Ser Thr Ala Val Asp Gly Leu Leu Lys Ala Gly Tyr Pro Cys
225 230 235 240

Phe Met Thr Glu Tyr Ala Gly Gly Ala Trp Gly Ser Gly Thr Gly Gly

245 250 255

Phe Asp Ile Gln Leu Thr Ser Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Ser Trp
260 265 270

Leu Thr Phe Gln Tyr Ile Pro Pro Ser Gly Val Ser Asp Asp Val Thr
275 280 285

Lys Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Leu Val Glu Asn Ala Gly Leu Ser Trp
290 295 300

Lys Pro Asp Tyr Gly Asn Trp Pro Ala Ala Arg Gly Val His Gly Asn
305 310 315 320

Gly Gly Leu Pro Arg Lys Thr Ser Thr Trp Val Asn Asn Phe Leu Thr
325 330 335

Gly Thr Thr Arg Ile Glu Ala Glu Asp Phe Asp Trp Gly Gly Asn Asp
340 345 350

Val Ser Phe Tyr Asp Lys Asp Ser Glu Asn Lys Gly Ala Gln Tyr Arg
355 360 365

Leu Asp Glu Ala Val Asp Ile Glu Thr Thr Lys Asp Ala Asp Gly Gly
370 375 380

Tyr Asn Val Gly Trp Ile Glu Asp Gly Glu Trp Leu Glu Tyr Thr Ile
385 390 395 400

Trp Val Gln His Pro Gly Tyr Tyr Asn Leu Ala Leu Arg Val Ala Asn
405 410 415

Asn Ser Gly Gly Ser Val Gln Val Asn Phe Gly Asn Gln Asp Lys Thr
420 425 430

Gly Thr Trp Val Leu Pro Val Thr Gly Gly Val Gln Thr Trp Lys Thr
435 440 445

Asp Thr Arg Gln Val Phe Leu Gly Ser Gly Arg Gln Lys Leu Arg Ile
450 455 460

Asn Ala Leu Ser Gly Gly Phe Asn Leu Asn Trp Ile Glu Leu Ser Pro
465 470 475 480

Val Ser Thr Gly Pro Ile Ala Asp Gly Thr Tyr Lys Phe Leu Asn Arg

485 490 495

Ala Asn Thr Met Thr Leu Gln Glu Val Thr Ser Asn Asn Ser Ile Val
500 505 510

Thr Ser Thr Tyr Lys Gly Thr Ala Asp Gln His Trp Lys Ile Gln His
515 520 525

Ile Gly Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Gly Arg Gly Trp Asn
530 535 540

Trp Asn Trp Trp Met Gly Phe Gly Thr Val Gly Trp Trp Gly Thr Gly
545 550 555 560

Ser Gly Thr Cys Phe Ile Ile Arg Pro Thr Gly Asp Gly Tyr Tyr Arg
565 570 575

Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Thr Asn Leu Glu Ile Ser Asn Asn Asp
580 585 590

Ser Ser Lys Ile Glu Gly Lys Ala Tyr His Glu Gly Ala Asn Gln Gln
595 600 605

Trp Ala Ile Gln Leu Pro Ser Ala Pro Val Phe Pro
610 615 620

<210> 8
<211> 865
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Xilanasa GH5_34 comercial de NZYtech

<400> 8

Ala Ile Ala Leu Ser Ile Leu Ser Phe Ile Pro Asn Arg Ala Tyr Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gln Arg Gly Arg Pro Arg Leu Asn Ala Ala Arg Thr Thr Phe
20 25 30

Val Gly Asp Asn Gly Gln Pro Leu Arg Gly Pro Tyr Thr Ser Thr Glu
35 40 45

Trp Thr Ala Ala Ala Pro Tyr Asp Gln Ile Ala Arg Val Lys Glu Leu
50 55 60

Gly Phe Asn Ala Val His Leu Tyr Ala Glu Cys Phe Asp Pro Arg Tyr
65 70 75 80

Pro Ala Pro Gly Ser Lys Ala Pro Gly Tyr Ala Val Asn Glu Ile Asp
85 90 95

Lys Ile Val Glu Arg Thr Arg Glu Leu Gly Leu Tyr Leu Val Ile Thr
100 105 110

Ile Gly Asn Gly Ala Asn Asn Gly Asn His Asn Ala Gln Trp Ala Arg
115 120 125

Asp Phe Trp Lys Phe Tyr Ala Pro Arg Tyr Ala Lys Glu Thr His Val
130 135 140

Leu Tyr Glu Ile His Asn Glu Pro Val Ala Trp Gly Pro Pro Tyr Ser
145 150 155 160

Ser Ser Thr Ala Asn Pro Pro Gly Ala Val Asp Met Glu Ile Asp Val
165 170 175

Tyr Arg Ile Ile Arg Thr Tyr Ala Pro Glu Thr Pro Val Leu Leu Phe
180 185 190

Ser Tyr Ala Val Phe Gly Gly Lys Gly Gly Ala Ala Glu Ala Leu Lys
195 200 205

Asp Ile Arg Ala Phe Asn Lys Ala Val Phe Gly Asn Glu Asn Ala Val
210 215 220

Trp Thr Asn Glu Ala Val Ala Phe His Gly Tyr Ala Gly Trp Gln Glu
225 230 235 240

Thr Thr Ile Ala Val Glu Glu Leu Leu Lys Ala Gly Tyr Pro Cys Phe
245 250 255

Met Thr Glu Tyr Ala Gly Gly Ala Trp Gly Ser Gly Met Gly Gly Leu
260 265 270

Asp Val Glu Leu Thr Tyr Glu Leu Glu Arg Leu Gly Val Ser Trp Leu
275 280 285

Thr Phe Gln Tyr Ile Pro Pro Thr Gly Val Ser Asp Asp Val Thr Lys
290 295 300

Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Leu Val Glu Asn Ser Gly Leu Ser Trp Thr
305 310 315 320

Pro Asp Tyr Gly Asn Trp Pro Ala Ala Arg Gly Val Tyr Gly Asn Gly
325 330 335

Gly Leu Ala Arg Glu Thr Ala Thr Trp Ile Asn Asn Phe Leu Thr Gly
340 345 350

Thr Thr Arg Ile Glu Ala Glu Asp Phe Asp Trp Gly Gly Asn Gly Val
355 360 365

Ser Tyr Tyr Asp Thr Asp Ser Val Asn Val Gly Gly Gln Tyr Arg Pro
370 375 380

Asp Glu Gly Val Asp Ile Glu Lys Thr Ser Asp Thr Gly Gly Gly Tyr
385 390 395 400

Asn Val Gly Trp Ile Ser Glu Gly Glu Trp Leu Glu Tyr Thr Ile Arg
405 410 415

Val Arg Asn Pro Gly Tyr Tyr Asn Leu Ser Leu Arg Val Ala Gly Ile
420 425 430

Ser Gly Ser Arg Val Gln Val Ser Phe Gly Asn Gln Asp Lys Thr Gly
435 440 445

Val Trp Glu Leu Pro Ala Thr Gly Gly Phe Gln Thr Trp Thr Thr Ala
450 455 460

Thr Arg Gln Val Phe Leu Gly Ala Gly Leu Gln Lys Leu Arg Ile Asn
465 470 475 480

Ala Leu Ser Gly Gly Phe Asn Leu Asn Trp Ile Glu Leu Ser Pro Ile
485 490 495

Ser Thr Gly Thr Ile Pro Asp Gly Thr Tyr Lys Phe Leu Asn Arg Ala
500 505 510

Asn Gly Lys Thr Leu Gln Glu Val Thr Gly Asn Asn Ser Ile Ile Thr
515 520 525

Ala Asp Tyr Lys Gly Ile Thr Glu Gln His Trp Lys Ile Gln His Ile
530 535 540

Gly Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Gly Arg Gly Trp Asn Trp
545 550 555 560

Asn Trp Trp Met Gly Phe Gly Thr Val Gly Trp Trp Gly Thr Gly Ser
565 570 575

Ser Thr Cys Phe Ile Ile Ser Pro Thr Gly Asp Gly Tyr Tyr Arg Ile
580 585 590

Val Leu Val Gly Asp Gly Thr Asn Leu Gln Ile Ser Ser Gly Asp Pro
595 600 605

Ser Lys Ile Glu Gly Lys Ala Phe His Gly Gly Ala Asn Gln Gln Trp
610 615 620

Ala Ile Leu Pro Val Ser Ala Pro Ala Phe Pro Thr Gly Leu Ser Ala
625 630 635 640

Val Leu Asp Ser Ser Gly Asn Thr Ala Asn Leu Thr Trp Asn Ala Ala
645 650 655

Pro Gly Ala Asn Ser Tyr Asn Val Lys Arg Ser Thr Lys Ser Gly Gly
660 665 670

Pro Tyr Thr Thr Ile Ala Thr Asn Ile Thr Ser Thr Asn Tyr Thr Asp
675 680 685

Thr Gly Val Ala Thr Gly Thr Lys Tyr Tyr Tyr Val Val Ser Ala Val
690 695 700

Ser Asn Gly Val Glu Thr Leu Asn Ser Ala Glu Ala Ile Leu Gln Tyr
705 710 715 720

Pro Lys Leu Thr Gly Thr Val Ile Gly Thr Gln Gly Ser Trp Asn Asn
725 730 735

Ile Gly Asn Thr Ile His Lys Ala Phe Asp Gly Asp Leu Asn Thr Phe
740 745 750

Phe Asp Gly Pro Thr Ala Asn Gly Cys Trp Leu Gly Leu Asp Phe Gly
755 760 765

Glu Gly Val Arg Asn Val Ile Thr Gln Ile Lys Phe Cys Pro Arg Ser
770 775 780

Gly Tyr Glu Gln Arg Met Ile Gly Gly Ile Phe Gln Gly Ala Asn Lys
785 790 795 800

Glu Asp Phe Ser Asp Ala Val Thr Leu Phe Thr Ile Thr Ser Leu Pro
805 810 815

Gly Ser Gly Thr Leu Thr Ser Val Asp Val Asp Asn Pro Thr Gly Phe
820 825 830

Arg Tyr Val Arg Tyr Leu Ser Pro Asp Gly Ser Asn Gly Asn Ile Ala
835 840 845

Glu Leu Gln Phe Phe Gly Thr Pro Ala Gly Glu Glu Asn Asp Asp Val
850 855 860

His
865

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

a) licuefacción del material que contiene almidón usando una alfa-amilasa;
b) sacarificación del material licuado usando una glucoamilasa;
c) fermentación usando un organismo fermentador, donde la sacarificación se realiza en presencia de una xilanasa GH5, donde la xilanasa GH5 se selecciona de la subfamilia 35.

2. Proceso según la reivindicación 1, donde el material que contiene almidón incluye maíz, granos de maíz, trigo, centeno, cebada, triticale, sorgo, pasto varilla, mijo, mijo perla, panizo o en una forma procesada tal como granos de maíz molidos, trigo molido, centeno molido, cebada molida, triticale molido, maíz molido, maíz desgrasado, maíz desgrasado desalmidonado, sorgo molido, pasto varilla molido, mijo molido, panizo molido, mijo perla molido.

3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el material que contiene almidón incluye xilano altamente ramificado.

4. Proceso según la reivindicación 1, donde la xilanasa GH5 de la subfamilia 35 se selecciona de las xilanasas representadas por los aminoácidos 37 a 573 de la SEQ ID N.º: 2, los aminoácidos 36 a 582 de la SEQ ID N.º: 4 o una xilanasa que tiene al menos un 75% de identidad con los aminoácidos 37 a 573 de la SEQ ID N.º: 2 o los aminoácidos 36 a 582 de la SEQ ID N.º: 4.

5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el material vegetal incluye maíz, sorgo, trigo, centeno, cebada o triticale.

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el producto de fermentación es alcohol, particularmente etanol.

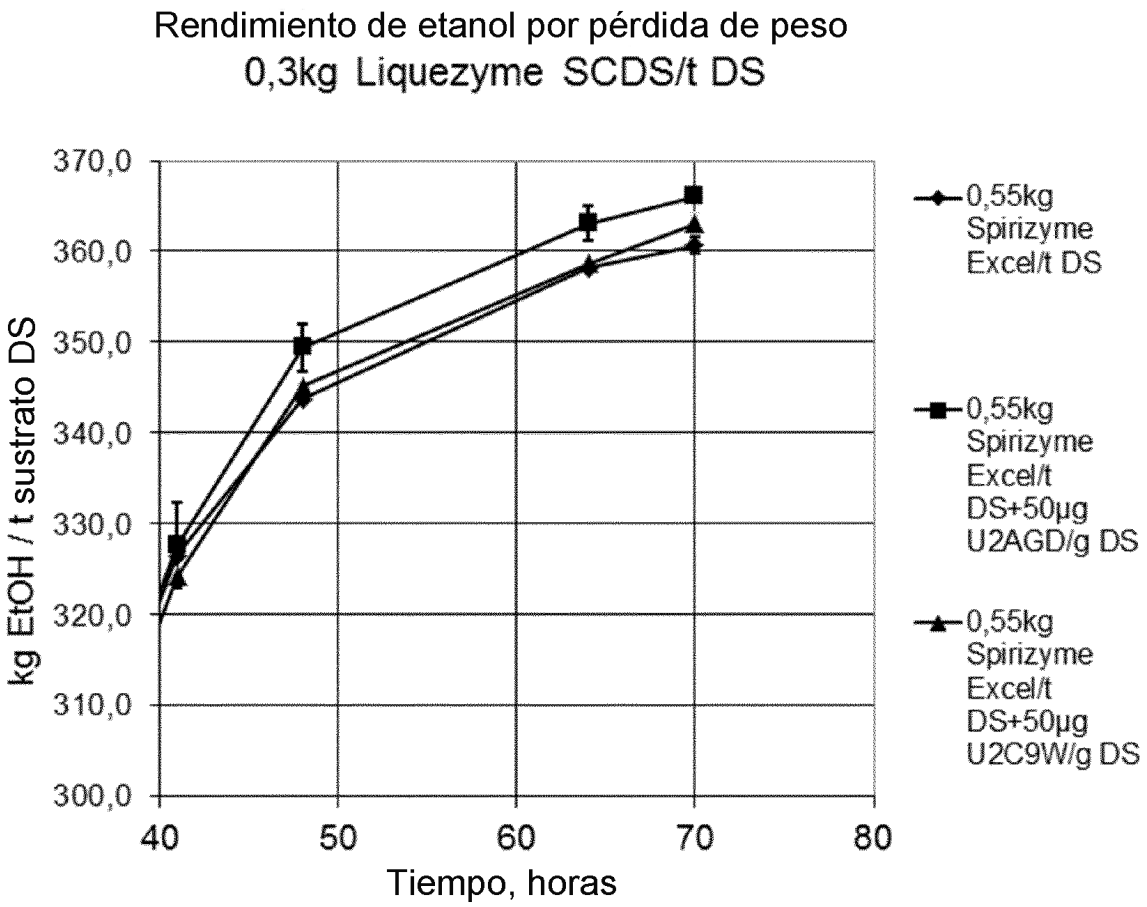
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el organismo fermentador es levadura, particularmente *Saccharomyces* sp., más particularmente *Saccharomyces cerevisiae*.

8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las etapas b) y c) se realizan simultáneamente.

9. Utilización de una xilanasa GH5 de la subfamilia 35 para producir etanol a partir de material que contiene almidón.

10. Utilización según la reivindicación 9, donde el material que contiene almidón incluye maíz, sorgo, trigo, centeno, cebada o triticale.

Figura 1


Rendimiento de etanol por pérdida de peso
0,3kg Liquezyme SCDS/t DS
370,0
360,0
350,0
340,0
330,0
320,0
310,0
300,0
kg EtOH / t sustrato DS
40
50
60
70
80
Tiempo, horas
0,55kg Spirizyme Excel/t DS
0,55kg Spirizyme Excel/t DS+50µg U2AGD/g DS
0,55kg Spirizyme Excel/t DS+50µg U2C9W/g DS