

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 896 153**

51 Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2015 PCT/CN2015/090204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16045569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2015 E 15844910 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3198001**

54 Título: **Procedimientos para producir etanol y organismos de fermentación**

30 Prioridad:

23.09.2014 WO PCT/CN2014/087191

11.12.2014 WO PCT/CN2014/093589

27.04.2015 WO PCT/CN2015/077496

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2022

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

DIAO, LIUYANG;

SUTTON, KATE BRANDON;

JIANG, YU;

YANG, SHENG;

QIAN, FENGHUI y

LIU, YINGMIAO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 896 153 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

Procedimientos para producir etanol y organismos de fermentación

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para producir etanol a partir de material celulósico, y a organismos fermentadores mejorados.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El etanol es un combustible de transporte que comúnmente se mezcla con la gasolina. El material celulósico se utiliza como materia prima en los procedimientos de producción de etanol. Existen varios procedimientos en la técnica para preparar hidrolizados de celulosa y hemicelulosas que contienen glucosa, manosa, xilosa y arabinosa. La glucosa y la manosa se convierten eficazmente en etanol durante el metabolismo anaeróbico natural. Con mucho, el microorganismo productor de etanol más eficiente es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* carece de las enzimas necesarias para convertir el azúcar dominante xilosa en xilulosa, y por lo tanto es incapaz de utilizar la xilosa como fuente de carbono. Hacerlo requiere la manipulación genética de *Saccharomyces cerevisiae* para que exprese enzimas que puedan convertir la xilosa en xilulosa. Una de las enzimas necesarias es la xilosa isomerasa (E.C. 5.3.1.5), que convierte la xilosa en xilulosa, que entonces se puede convertir en etanol durante la fermentación mediante *Saccharomyces cerevisiae*.

El documento WO 2003/062430 describe que la introducción de una *Piromyces xilosa* isomerasa (XI) funcional en *Saccharomyces cerevisiae* permite el metabolismo lento de la xilosa a través de la xiluloquinasa endógena (EC 2.7.1.17) codificada por *XKS1* y las enzimas de la parte no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato, y confiere a los transformantes de levadura la capacidad para crecer en xilosa.

La patente US no. 8.586.336-B2 describió una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que expresa una xilosa isomerasa obtenida del fluido del rumen bovino. La cepa de levadura se puede utilizar para producir etanol mediante el cultivo en condiciones de fermentación anaeróbica.

Diao et al., 2013, BMC Biotechnology 13, p 1-9, describen la construcción de levadura de fermentación rápida de xilosa, CIBTS0735, basada en xilosa isomerasa y *S. cerevisiae* diploide industrial por diseño racional y evolución adaptativa.

A pesar de la mejora significativa de los procedimientos de producción de etanol a partir de material celulósico durante la última década, todavía existe el deseo y la necesidad de proporcionar procedimientos mejorados. Para producir etanol económicamente, se requiere un organismo de fermentación que sea biológicamente eficiente.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir etanol, que comprende:

(a) sacarificar un material celulósico con una composición de enzima celulolítica;

(b) fermentar el material celulósico sacarificado con un microorganismo fermentador para producir etanol; en el que el organismo fermentador es *Saccharomyces cerevisiae* CIBTS1260 (depositado con el número de acceso NRRL Y-50973 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Illinois 61604 U.S.A.).

En otro aspecto, la invención se refiere a un organismo recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* CIBTS1260, depositado con el número de acceso NRRL Y-50973 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Illinois 61604 U.S.A.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra un mapa plasmídico del plásmido pYIE2-mgXI-GXF1-delta que alberga los casetes de expresión mgXI y GXF.

La Fig. 2 muestra un mapa plasmídico del plásmido usado pSH47-hyg.

La Fig. 3 muestra un mapa del plásmido resultante pYIE2-XKS1-PPP-δ.

La Fig. 4 muestra una comparación de fermentación de CIBTS1260 frente a BSGX001 en hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado con ácido NREL a 1 g de DCW/l de incorporación de levadura, 35°C, pH 5,5, en 72 horas.

La Fig. 5 muestra una comparación de *Saccharomyces cerevisiae* frente a BSGX001 en medio modelo: 2/l de incorporación de levadura, 32°C, pH 5,5, 72 horas.

La Fig. 6 muestra una comparación de la fermentación de hidrolizado de bagazo generado con Composición de Enzima Celulolítica CA y Composición de Enzima Celulolítica CB con CIBTS1260 a 1 g/l de incorporación de levadura en 72 horas.

La Fig. 7 muestra la reducción porcentual de la concentración de DP2 durante la fermentación de hidrolizados generados con celulasa CA o CB a 1 g/l de incorporación de levadura, 35°C, pH 5,5, 72 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona procedimientos mejorados para producir etanol a partir de material lignocelulósico utilizando un organismo fermentador.

Definiciones

Actividad auxiliar 9: La expresión "Actividad auxiliar 9" o "AA9" significa un polipéptido clasificado como polisacárido monooxigenasa lítica (Quinlan et al, 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 208: 15079-15084; Phillips et al, 2011, ACS Chem. Biol. 6: 1399-1406; Lin et al, 2012, Structure 20: 1051-1061). Los polipéptidos AA9 se clasificaron anteriormente en la familia de glucósido hidrolasa 61 (GH61) según Henrissat, 1991, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat y Bairoch, 1996, Biochem. J. 316: 695-696.

Los polipéptidos AA9 potencian la hidrólisis de un material celulósico por una enzima que tiene actividad celulolítica. La actividad potenciadora celulolítica se puede determinar midiendo el aumento de azúcares reductores o el aumento del total de celobiosa y glucosa a partir de la hidrólisis de un material celulósico por enzima celulolítica en las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína total/g de celulosa en rastrojo de maíz pretratado (PCS), en la que la proteína total está compuesta de 50-99,5% p/p de proteína de enzima celulolítica y 0,5-50% p/p de proteína de un polipéptido AA9 durante 1-7 días a una temperatura adecuada, tal como 40°C-80°C, por ejemplo 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, o 70°C, y un pH adecuado, tal como 4-9, por ejemplo 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, u 8,5, en comparación con una hidrólisis de control con igual carga de proteína total sin actividad potenciadora celulolítica (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS).

La actividad potenciadora del polipéptido AA9 se puede determinar usando una mezcla de CELLULAST™ 1.5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) y beta-glucosidasa como fuente de la actividad celulolítica, en la que la beta-glucosidasa está presente en un peso de al menos 2-5% de proteína de la carga de proteína celulasa. En un aspecto, la beta-glucosidasa es una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (por ejemplo, producida de forma recombinante en *Aspergillus oryzae* de acuerdo al documento WO 02/095014). En otro aspecto, la beta-glucosidasa es una beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, producida de forma recombinante en *Aspergillus oryzae* como se describe en el documento WO 02/095014).

La actividad potenciadora del polipéptido AA9 también se puede determinar incubando un polipéptido AA9 con celulosa hinchada con ácido fosfórico al 0,5% (PASC), acetato de sodio 100 mM pH 5, MnSO₄ 1 mM, ácido gálico al 0,1%, 0,025 mg/ml de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*, y TRITON® X-100 al 0,01% (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol) durante 24-96 horas a 40°C, seguido de la determinación de la glucosa liberada de la PASC.

La actividad potenciadora del polipéptido AA9 también se puede determinar según el documento WO 2013/028928 para composiciones de alta temperatura.

Los polipéptidos AA9 mejoran la hidrólisis de un material celulósico catalizada por una enzima que tiene actividad celulolítica al reducir la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis, preferiblemente al menos 1,01 veces, por ejemplo al menos 1,05 veces, al menos 1,10 veces, al menos 1,25 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces.

Beta-glucosidasa: El término "beta-glucosidasa" significa una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de restos terminales de beta-D-glucosa no reductores con la liberación de beta-D-glucosa. La actividad de la beta-glucosidasa se puede determinar usando p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato según el procedimiento de Venturi et al., 2002, J. Basic Microbiol. 42: 55-66. Una unidad de beta-glucosidasa se define como 1,0 µmol de anión p-nitrofenolato producido por minuto a 25°C, pH 4,8, a partir de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido 1 mM como sustrato en citrato de sodio 50 mM que contiene TWEEN® 20 al 0,01%.

Beta-xilosidasa: El término "beta-xilosidasa" significa una beta-D-xilósido xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exohidrólisis de beta (1→4)-xilooligosacáridos cortos para eliminar sucesivos restos de D-xilosa de los extremos no reductores. La actividad de la beta-xilosidasa se puede determinar usando p-nitrofenil-beta-D-xilósido 1 mM como sustrato en citrato de sodio 100 mM que contiene TWEEN® 20 al 0,01% a pH 5, 40°C. Una unidad de beta-xilosidasa

se define como 1,0 μmol de anión p-nitrofenolato producido por minuto a 40°C, pH 5, a partir de p-nitrofenil-beta-D-xilósido 1 mM en citrato de sodio 100 mM que contiene TWEEN® 20 al 0,01%.

Catalasa: El término “catalasa” significa un peróxido de hidrógeno:peróxido de hidrógeno oxidoreductasa (EC 1.11.1.6) que cataliza la conversión de $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$. Para los fines de la presente invención, la actividad de catalasa se determina según la Patente U.S. No. 5.646.025. Una unidad de actividad de catalasa equivale a la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de peróxido de hidrógeno en las condiciones del ensayo.

Celobiohidrolasa: El término “celobiohidrolasa” significa una 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91 y E.C. 3.2.1.176) que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, celooligosacáridos, o cualquier polímero que contiene glucosa con enlaces beta-1,4, liberando celobiosa del extremo reductor (celobiohidrolasa I) o del extremo no reductor (celobiohidrolasa II) de la cadena (Teeri, 1997, Trends in Biotechnology 15: 160-167; Teeri et al., 1998, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178). La actividad de celobiohidrolasa se puede determinar según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeysens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288; y Tomme et al., 1988, Eur. Biochem. 170: 575-581.

Composición de enzima celulolítica o celulasa: La expresión “composición de enzima celulolítica” o “celulasa” significa una o más (por ejemplo, varias) enzimas que hidrolizan un material celulósico. Tales enzimas incluyen endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s), beta-glucosidasa(s), o combinaciones de las mismas. Los dos enfoques básicos para medir la actividad de la enzima celulolítica incluyen: (1) medir la actividad de la enzima celulolítica total, y (2) medir las actividades de las enzimas celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas), como se revisa en Zhang et al., 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481. La actividad de la enzima celulolítica total se puede medir utilizando sustratos insolubles, incluyendo papel de filtro Whatman N°1, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa de algas, algodón, lignocelulosa pretratada, etc. El ensayo de actividad celulolítica total más común es el ensayo de papel de filtro con papel de filtro Whatman N°1 como sustrato. El ensayo fue establecido por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Ghose, 1987, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

La actividad de la enzima celulolítica se puede determinar midiendo el aumento en la producción/liberación de azúcares durante la hidrólisis de un material celulósico por enzima(s) celulolítica(s) en las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína de enzima celulolítica/g de celulosa en rastrojo de maíz pretratado (PCS) (u otro material celulósico pretratado) durante 3-7 días a una temperatura adecuada, tal como 40°C-80°C, por ejemplo 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, o 70°C, y un pH adecuado tal como 4-9, por ejemplo 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0, en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína de enzima celulolítica. Las condiciones típicas son reacciones de 1 ml, PCS lavado o sin lavar, 5% de sólidos insolubles (peso seco), acetato de sodio 50 mM pH 5, MnSO_4 1 mM, 50°C, 55°C o 60°C, 72 horas, análisis de azúcar mediante cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Material celulósico: La expresión “material celulósico” significa cualquier material que contenga celulosa. El polisacárido predominante en la pared celular primaria de la biomasa es la celulosa, el segundo más abundante es la hemicelulosa, y el tercero es la pectina. La pared celular secundaria, producida después de que la célula ha dejado de crecer, también contiene polisacáridos, y está reforzada por lignina polimérica reticulada covalentemente a hemicelulosa. La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa, y de este modo es un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras que las hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos, y mananos en estructuras ramificadas complejas con un espectro de sustituyentes. Aunque generalmente es polimorfa, la celulosa se encuentra en el tejido vegetal principalmente como una matriz cristalina insoluble de cadenas de glucanos paralelas. Las hemicelulosas suelen unirse por enlaces de hidrógeno a la celulosa, así como a otras hemicelulosas, que ayudan a estabilizar la matriz de la pared celular.

La celulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, vainas, cáscaras, y mazorcas de plantas, u hojas, ramas, y madera de árboles. El material celulósico puede ser, pero no se limita a, restos agrícolas, material herbáceo (incluyendo cultivos energéticos), restos sólidos urbanos, restos de fábricas de pulpa y papel, papel de desecho, y madera (incluyendo restos forestales) (véanse, por ejemplo, Wiseloge et al., 1995, en Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), p. 105-118, Taylor y Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, managing editor, Volumen 65, p. 23-40, Springer-Verlag, Nueva York). Se entiende aquí que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un material de la pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa y hemicelulosa en una matriz mixta. En un aspecto, el material celulósico es cualquier material de biomasa. En otro aspecto, el material celulósico es lignocelulosa, que comprende celulosa, hemicelulosas y lignina.

El material celulósico puede ser restos agrícolas, material herbáceo (incluyendo los cultivos energéticos), restos sólidos urbanos, restos de fábricas de pulpa y papel, papel de desecho, o madera (incluyendo los restos forestales).

El material celulósico puede ser arundo, bagazo, bambú, mazorca de maíz, fibra de maíz, rastrojo de maíz, miscanthus, paja de arroz, pasto varilla, o paja de trigo.

El material celulósico puede ser álamo temblón, eucalipto, abeto, pino, álamo, píceo, o sauce.

El material celulósico puede ser celulosa de algas, celulosa bacteriana, línter de algodón, papel de filtro, celulosa microcristalina (por ejemplo, AVICEL®), o celulosa tratada con ácido fosfórico.

El material celulósico puede ser una biomasa acuática. Como se usa aquí, la expresión “biomasa acuática” significa biomasa producida en un ambiente acuático mediante un proceso de fotosíntesis. La biomasa acuática puede ser algas, plantas emergentes, plantas de hojas flotantes, o plantas sumergidas.

El material celulósico puede usarse tal cual, o puede someterse a un pretratamiento, usando métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en el presente documento. En un aspecto preferido, el material celulósico se trata previamente.

Endoglucanasa: El término “endoglucanasa” significa una 4-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.4) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en celulosa, derivados de celulosa (tales como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3-1,4 glucanos mixtos, tales como beta-D-glucanos o xiloglucanos de cereales, y otro material vegetal que contenga componentes celulósicos. La actividad de endoglucanasa se puede determinar midiendo la reducción en la viscosidad del sustrato o el aumento en los extremos reductores determinados por un ensayo de azúcar reductor (Zhang et al., 2006, *Biotechnology Advances* 24: 452-481). La actividad de endoglucanasa también se puede determinar usando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato según el procedimiento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268, a pH 5, 40°C.

Enzima hemicelulolítica o hemicelulasa: La expresión “enzima hemicelulolítica” o “hemicelulasa” significa una o más (por ejemplo, varias) enzimas que hidrolizan un material hemicelulósico. Véase, por ejemplo, Shallom y Shoham, 2003, *Current Opinion In Microbiology* 6(3): 219-228). Las hemicelulasas son componentes clave en la degradación de la biomasa vegetal. Los ejemplos de hemicelulasas incluyen, pero no se limitan a, una acetilmanano esterasa, una acetilxilano esterasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una glucuronol esterasa, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa. Los sustratos de estas enzimas, las hemicelulasas, son un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados y lineales que se unen mediante enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa en la pared celular de la planta, reticulándolas en una red robusta. Las hemicelulasas también se unen covalentemente a la lignina, formando junto con la celulosa una estructura muy compleja. La estructura y organización variables de las hemicelulasas requieren la acción concertada de muchas enzimas para su completa degradación. Los módulos catalíticos de las hemicelulasas son glucósido hidrolasas (GH) que hidrolizan enlaces glucosídicos, o carbohidrato esterases (CE), que hidrolizan enlaces de éster de acetato o de grupos laterales de ácido ferúlico. Estos módulos catalíticos, basados en la homología de su secuencia primaria, pueden asignarse a las familias GH y CE. Algunas familias, con un pliegue general similar, pueden agruparse en clanes, marcados alfabéticamente (por ejemplo, GH-A). Una clasificación más informativa y actualizada de estas y otras enzimas activas de carbohidratos está disponible en la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZy). Las actividades de las enzimas hemicelulolíticas se pueden medir según Ghose y Bisaria, 1987, *Pure & Appl. Chem.* 59: 1739-1752, a una temperatura adecuada tal como 40°C-80°C, por ejemplo 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, o 70°C, y un pH adecuado tal como 4-9, por ejemplo 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, o 7,0.

Rastrojo de maíz pretratado: La expresión “rastrojo de maíz pretratado” o “PCS” significa un material celulósico derivado de rastrojo de maíz por tratamiento con calor y ácido sulfúrico diluido, pretratamiento alcalino, pretratamiento neutro, o cualquier pretratamiento conocido en la técnica.

Material que contiene xilano: La expresión “material que contiene xilano” significa cualquier material que comprende un polisacárido de la pared celular vegetal que contiene una cadena principal de restos de xilosa enlazados en beta (1-4). Los xilanos de las plantas terrestres son heteropolímeros que poseen una cadena principal de beta-(1-4)-D-xilopiranososa, que está ramificada por cadenas cortas de hidratos de carbono. Comprende ácido D-glucurónico o su 4-O-metiléter, L-arabinosa, y/o diversos oligosacáridos, compuestos de D-xilosa, L-arabinosa, D- o L-galactosa, y D-glucosa. Los polisacáridos de tipo xilano se pueden dividir en homoxilanos y heteroxilanos, que incluyen glucuronoxilanos, (arabino)glucuronoxilanos, (glucurono)arabinoxilanos, arabinoxilanos, y heteroxilanos complejos. Véase, por ejemplo, Ebringerova et al., 2005, *Adv. Polym. Sci.* 186: 1-67.

En los procedimientos de la presente invención, puede usarse cualquier material que contenga xilano. En un aspecto preferido, el material que contiene xilano es material celulósico.

Actividad degradante de xilano o actividad xilanolítica: La expresión “actividad degradante de xilano” o “actividad xilanolítica” significa una actividad biológica que hidroliza material que contiene xilano. Los dos enfoques básicos para medir la actividad xilanolítica incluyen: (1) medir la actividad xilanolítica total, y (2) medir las actividades xilanolíticas individuales (por ejemplo, endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, acetilxilano

esterasas, feruloil esterasas, y alfa-glucuronil esterasas). El progreso reciente en los ensayos de enzimas xilanolíticas se resumió en varias publicaciones, que incluyen Biely y Puchard, 2006, Journal of the Science of Food and Agriculture 86(11): 1636-1647; Spanikova y Biely, 2006, FEBS Letters 580(19): 4597-4601; Herrmann et al., 1997, Biochemical Journal 321: 375-381.

La actividad degradante de xilano total puede medirse determinando los azúcares reductores formados a partir de diversos tipos de xilano, incluyendo, por ejemplo, xilanos de avena espelta, madera de haya y madera de alerce, o mediante determinación fotométrica de fragmentos de xilano teñidos liberados de diversos xilanos teñidos covalentemente. Un ensayo común de actividad xilanolítica total se basa en la producción de azúcares reductores a partir de 4-O-metil glucuronoxilano polimérico, como se describe en Bailey et al., 1992, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, Journal of Biotechnology 23(3): 257-270. La actividad de xilanasa también se puede determinar con AZCL-arabinoxilano al 0,2% como sustrato en TRITON® X-100 al 0,01% y fosfato de sodio 200 mM pH 6 a 37°C. Una unidad de actividad de xilanasa se define como 1,0 µmol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6, a partir de AZCL-arabinoxilano al 0,2% como sustrato en fosfato sódico 200 mM pH 6.

La actividad degradante de xilano se puede determinar midiendo el aumento en la hidrólisis del xilano de madera de abedul (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, MO, USA) por la(s) enzima(s) degradante(s) de xilano en las siguientes condiciones típicas: reacciones de 1 ml, 5 mg/ml de sustrato (sólidos totales), 5 mg de proteína xilanolítica/g de sustrato, acetato de sodio 50 mM pH 5, 50°C, 24 horas, análisis de azúcar usando el ensayo de hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) como se describe por Lever, 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279.

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

Xilosa isomerasa: La expresión "xilosa isomerasa" o "XI" significa una enzima que puede catalizar D-xilosa en D-xilulosa in vivo, y convertir D-glucosa en D-fructosa in vitro. La xilosa isomerasa también se conoce como "glucosa isomerasa", y se clasifica como E.C. 5.3.1.5. Como la estructura de la enzima es muy estable, la xilosa isomerasa es uno de los buenos modelos para estudiar las relaciones entre la estructura y las funciones de las proteínas (Karimaki et al., Protein Eng Des Sel, 12004, 17 (12):861-869). Además, el valor de aplicación industrial extremadamente importante hace que la xilosa isomerasa se considere una enzima industrial tan importante como la proteasa y la amilasa (Tian Shen et al., Microbiology Bulletin, 2007, 34 (2): 355-358; Bhosale et al., Microbiol Rev, 1996, 60 (2): 280-300). Los científicos mantienen una gran preocupación, y llevaron a cabo una extensa investigación sobre la xilosa isomerasa. Desde la década de 1970, las aplicaciones de la xilosa isomerasa se han centrado en la producción de jarabe con alto contenido en fructosa y etanol combustible. En los últimos años, los científicos han descubierto que, en determinadas condiciones, la xilosa isomerasa se puede utilizar para producir muchos azúcares raros importantes, que son los materiales de producción en la industria farmacéutica, tales como ribosa, manosa, arabinosa, y lixosa (Karimaki et al., Protein Eng Des Sel, 12004, 17 (12): 861-869). Estos hallazgos aportan nueva vitalidad a la investigación sobre la xilosa isomerasa.

Procedimientos de la invención

La presente invención también se refiere a procedimientos para producir etanol, que comprenden:

(a) sacarificar un material celulósico con una composición de enzima celulolítica;

(b) fermentar el material celulósico sacarificado con un microorganismo fermentador para producir etanol; en el que el organismo fermentador es *Saccharomyces cerevisiae* CIBTS1260 (depositado con el número de acceso NRRL Y-50973 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Illinois 61604 USA.).

En una realización preferida, el procedimiento comprende recuperar el etanol del medio de fermentación.

El procesamiento del material celulósico según la presente invención se puede lograr usando métodos convencionales en la técnica. Además, los procedimientos de la presente invención pueden implementarse usando cualquier aparato de procesamiento de biomasa convencional configurado para operar según la invención.

La sacarificación (es decir, hidrólisis) y fermentación, separadas o simultáneas, incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis y fermentación separadas (SHF); sacarificación y fermentación simultáneas (SSF); sacarificación y co-fermentación simultáneas (SSCF); hidrólisis y fermentación híbridas (HHF); hidrólisis y co-fermentación separadas (SHCF); hidrólisis y co-fermentación híbridas (HHCF).

SHF utiliza etapas de procedimiento separadas para hidrolizar primero enzimáticamente el material celulósico a azúcares fermentables, por ejemplo monómeros de glucosa, celobiosa y pentosa, y después fermentar los azúcares fermentables a etanol. En SSF, la hidrólisis enzimática del material celulósico y la fermentación de azúcares a etanol

se combinan en una sola etapa (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). SSCF implica la co-fermentación de múltiples azúcares (Sheehan y Himmel, 1999, Biotechnol. Prog. 15: 817-827). HHF implica una etapa de hidrólisis separada, y además, una etapa de sacarificación e hidrólisis simultáneas, que se pueden llevar a cabo en el mismo reactor. Las etapas en un procedimiento de HHF se pueden llevar a cabo a diferentes temperaturas, es decir, sacarificación enzimática a alta temperatura, seguida de SSF a una temperatura más baja que el organismo de fermentación puede tolerar. Se entiende aquí que cualquier método conocido en la técnica que comprenda pretratamiento, hidrólisis enzimática (sacarificación), fermentación, o una combinación de los mismos, puede usarse en la práctica de los procedimientos de la presente invención.

Un aparato convencional puede incluir un reactor agitado alimentado discontinuo, un reactor agitado discontinuo, un reactor agitado de flujo continuo con ultrafiltración, y/o un reactor de columna de flujo pistón continuo (de Castilhos Corazza et al., 2003, Acta Scientiarum. Technology 25: 33-38; Gusakov y Sinitsyn, 1985, Enz. Microb. Technol. 7: 346-352), un reactor de atrición (Ryu y Lee, 1983, Biotechnol. Bioeng. 25: 53-65). Los tipos de reactores adicionales incluyen reactores para hidrólisis y/o fermentación de tipo lecho fluidizado, de manto de flujo ascendente, inmovilizados, y extrusora.

Pretratamiento

En una realización, el material celulósico se trata previamente antes de la sacarificación en la etapa (a).

Al poner en práctica los procedimientos de la presente invención, se puede utilizar cualquier procedimiento de pretratamiento conocido en la técnica para romper los componentes de la pared celular vegetal del material celulósico (Chandra et al., 2007, Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. 108: 67-93; Galbe y Zacchi, 2007, Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. 108: 41-65; Hendriks y Zeeman, 2009, Bioresource Technology 100: 10-18; Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686; Taherzadeh y Karimi, 2008, Int. J. Mol. Sci. 9: 1621-1651; Yang y Wyman, 2008, Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofr. 2: 26-40).

El material celulósico también puede someterse a reducción del tamaño de partícula, tamizado, remojo previo, humectación, lavado, y/o acondicionamiento antes del pretratamiento, usando métodos conocidos en la técnica.

Los pretratamientos convencionales incluyen, pero no se limitan a, pretratamiento con vapor (con o sin explosión), pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con agua caliente, pretratamiento alcalino, pretratamiento con cal, oxidación húmeda, explosión húmeda, explosión de fibra con amoníaco, pretratamiento de organosolv, y pretratamiento biológico. Los pretratamientos adicionales incluyen pretratamientos de percolación de amoníaco, ultrasonido, electroporación, microondas, CO₂ supercrítico, H₂O supercrítico, ozono, líquido iónico, e irradiación gamma.

En una realización preferida, el material celulósico se trata previamente antes de la sacarificación (es decir, la hidrólisis) y/o la fermentación. El pretratamiento se realiza preferiblemente antes de la hidrólisis. Alternativamente, el pretratamiento se puede llevar a cabo simultáneamente con la hidrólisis enzimática para liberar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa y/o celobiosa. En la mayoría de los casos, la propia etapa de pretratamiento da como resultado cierta conversión de biomasa en azúcares fermentables (incluso en ausencia de enzimas).

Pretratamiento con vapor. En el pretratamiento con vapor, el material celulósico se calienta para romper los componentes de la pared celular de la planta, incluyendo la lignina, la hemicelulosa, y la celulosa, para hacer que la celulosa y otras fracciones, por ejemplo hemicelulosa, sean accesibles a las enzimas. El material celulósico se hace pasar a o a través de una vasija de reacción en la que se inyecta vapor de agua para aumentar la temperatura hasta la temperatura y presión requeridas, y se retiene allí durante el tiempo de reacción deseado. El pretratamiento con vapor se realiza preferiblemente a 140-250°C, por ejemplo 160-200°C o 170-190°C, en el que el intervalo de temperatura óptimo depende de la adición opcional de un catalizador químico. El tiempo de residencia para el pretratamiento con vapor es preferiblemente 1-60 minutos, por ejemplo 1-30 minutos, 1-20 minutos, 3-12 minutos, o 4-10 minutos, en el que el tiempo de residencia óptimo depende de la temperatura y la adición opcional de un catalizador químico. El pretratamiento con vapor permite cargas de sólidos relativamente altas, de modo que el material celulósico generalmente solo está húmedo durante el pretratamiento. El pretratamiento con vapor a menudo se combina con una descarga explosiva del material después del pretratamiento, lo que se conoce como explosión de vapor, es decir, vaporización rápida a presión atmosférica y flujo turbulento del material para aumentar la superficie accesible por fragmentación (Duff y Murray, 1996, Bioresource Technology 85: 1-33; Galbe y Zacchi, 2002, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 618-628; Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0164730). Durante el pretratamiento con vapor, los grupos acetilo de hemicelulosa se escinden, y el ácido resultante autocataliza la hidrólisis parcial de la hemicelulosa a monosacáridos y oligosacáridos. La lignina se elimina solo de forma limitada.

Pretratamiento químico. La expresión "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina. Tal pretratamiento puede convertir la celulosa cristalina en celulosa amorfa. Ejemplos de procedimientos de pretratamiento químico adecuados incluyen,

por ejemplo, pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con cal, oxidación húmeda, expansión de fibra con amoníaco/congelación (AFEX), percolación con amoníaco (APR), líquido iónico, y pretratamientos de organosolv.

Algunas veces se añade un catalizador químico, tal como H_2SO_4 o SO_2 (típicamente 0,3 a 5% p/p), antes del pretratamiento con vapor, lo que disminuye el tiempo y la temperatura, aumenta la recuperación, y mejora la hidrólisis enzimática (Ballesteros et al., 2006, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 496-508; Varga et al., 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116: 509-523; Sassner et al., 2006, *Enzyme Microb. Technol.* 39: 756-762). En el pretratamiento con ácido diluido, el material celulósico se mezcla con ácido diluido, típicamente H_2SO_4 , y agua para formar una suspensión, se calienta con vapor hasta la temperatura deseada, y después de un tiempo de residencia, se evapora a presión atmosférica. El pretratamiento con ácido diluido se puede realizar con varios diseños de reactores, por ejemplo reactores de flujo pistón, reactores en contracorriente, o reactores de lecho retráctil en contracorriente continuo (Duff y Murray, 1996, *Bioresource Technology* 85: 1-33; Schell et al., 2004, *Bioresource Technology* 91: 179-188; Lee et al., 1999, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 93-115). En una realización específica, el pretratamiento con ácido diluido del material celulósico se lleva a cabo usando ácido sulfúrico al 4% p/p a 180°C durante 5 minutos.

También se pueden utilizar varios métodos de pretratamiento en condiciones alcalinas. Estos pretratamientos alcalinos incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio, cal, oxidación húmeda, percolación con amoníaco (APR), y pretratamiento expansión de fibra con amoníaco/congelación (AFEX).

El pretratamiento con cal se realiza con óxido de calcio o hidróxido de calcio a temperaturas de 85-150°C y tiempos de residencia de 1 hora a varios días (Wyman et al., 2005, *Bioresource Technology* 96: 1959-1966; Mosier et al., 2005, *Bioresource Technology* 96: 673-686). Los documentos WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900, y WO 2006/110901 describen métodos de pretratamiento que utilizan amoníaco.

La oxidación húmeda es un pretratamiento térmico que se realiza típicamente a 180-200°C durante 5-15 minutos con la adición de un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o sobrepresión de oxígeno (Schmidt y Thomsen, 1998, *Bioresource Technology* 64: 139-151; Palonen et al., 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 1-17; Varga et al., 2004, *Biotechnol. Bioeng.* 88: 567-574; Martin et al., 2006, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1669-1677). El pretratamiento se realiza preferiblemente a 1-40% de materia seca, por ejemplo 2-30% de materia seca, o 5-20% de materia seca, y con frecuencia el pH inicial se incrementa mediante la adición de álcali tal como carbonato de sodio.

Una modificación del método de pretratamiento de oxidación húmeda, conocida como explosión húmeda (combinación de oxidación húmeda y explosión de vapor) puede manipular materia seca hasta en un 30%. En explosión húmeda, el agente oxidante se introduce durante el pretratamiento después de un cierto tiempo de residencia. El pretratamiento se finaliza entonces evaporando de forma instantánea a presión atmosférica (documento WO 2006/032282).

La expansión de fibra con amoníaco (AFEX) implica tratar el material celulósico con amoníaco líquido o gaseoso a temperaturas moderadas tales como 90-150°C y alta presión tal como 17-20 bares durante 5-10 minutos, en la que el contenido de materia seca puede ser tan alto como 60% (Gollapalli et al., 2002, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 23-35; Chundawat et al., 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 96: 219-231; Alizadeh et al., 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 1133-1141; Teymouri et al., 2005, *Bioresource Technology* 96: 2014-2018). Durante el pretratamiento con AFEX, la celulosa y las hemicelulosas permanecen relativamente intactas. Se escinden los complejos de lignina-hidrato de carbono.

El pretratamiento de organosolv designifica el material celulósico mediante extracción con etanol acuoso (etanol al 40-60%) a 160-200°C durante 30-60 minutos (Pan et al., 2005, *Biotechnol. Bioeng.* 90: 473-481; Pan et al., 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 94: 851-861; Kurabi et al., 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 219-230). Normalmente se añade ácido sulfúrico como catalizador. En el pretratamiento de organosolv, se elimina la mayor parte de la hemicelulosa y la lignina.

Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados se describen en Schell et al., 2003, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105-108: 69-85, y Mosier et al., 2005, *Bioresource Technology* 96: 673-686, y Solicitud Publicada 2002/0164730.

En un aspecto, el pretratamiento químico se lleva a cabo preferiblemente como un tratamiento con ácido diluido, y más preferiblemente como un tratamiento con ácido diluido continuo. El ácido es típicamente ácido sulfúrico, pero también se pueden usar otros ácidos, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno, o mezclas de los mismos. El tratamiento con ácido suave se realiza en el intervalo de pH de preferiblemente 1-5, por ejemplo 1-4 o 1-2,5. En un aspecto, la concentración de ácido está en el intervalo de preferiblemente 0,01 a 10% en peso de ácido, por ejemplo 0,05 a 5% en peso de ácido, o 0,1 a 2% en peso de ácido. El ácido se pone en contacto con el material celulósico y se mantiene a una temperatura en el intervalo de preferiblemente 140-200°C, por ejemplo 165-190°C, durante periodos que oscilan de 1 a 60 minutos.

En otro aspecto, el pretratamiento tiene lugar en una suspensión acuosa. En aspectos preferidos, el material celulósico está presente durante el pretratamiento en cantidades preferiblemente entre 10-80% en peso, por ejemplo 20-70% en

peso, o 30-60% en peso, tal como alrededor de 40% en peso. El material celulósico pretratado puede no lavarse o lavarse usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo lavarse con agua.

Pretratamiento mecánico o pretratamiento físico: La expresión “pretratamiento mecánico” o “pretratamiento físico” se refiere a cualquier pretratamiento que promueva la reducción del tamaño de las partículas. Por ejemplo, dicho pretratamiento puede implicar diversos tipos de trituración o molienda (por ejemplo, molienda en seco, molienda en húmedo, o molienda con bolas vibratorias).

El material celulósico se puede pretratar tanto física (mecánicamente) como químicamente. El pretratamiento mecánico o físico se puede combinar con aplicación de vapor/explosión de vapor, hidrotérmólisis, tratamiento con ácido diluido o suave, alta temperatura, tratamiento de alta presión, irradiación (por ejemplo, irradiación de microondas), o combinaciones de los mismos. En un aspecto, alta presión significa presión en el intervalo de preferiblemente alrededor de 100 a alrededor de 400 psi, por ejemplo alrededor de 150 a alrededor de 250 psi. En otro aspecto, temperatura alta significa temperatura en el intervalo de alrededor de 100 a alrededor de 300°C, por ejemplo alrededor de 140 a alrededor de 200°C. En un aspecto preferido, el pretratamiento mecánico o físico se realiza en un procedimiento por lotes usando un sistema hidrolizador de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura como se define anteriormente, por ejemplo, un hidrolizador Sunds disponible de Sunds Defibrator AB, Suecia. Los pretratamientos físicos y químicos se pueden realizar de forma secuencial o simultánea, según se desee.

Por consiguiente, en un aspecto preferido, el material celulósico se somete a un pretratamiento físico (mecánico) o químico, o cualquier combinación de los mismos, para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

Pretratamiento biológico. La expresión “pretratamiento biológico” se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material celulósico. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación de microorganismos y/o enzimas solubilizantes de la lignina (véanse, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh y Singh, 1993, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, en Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, 65: 207-241; Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; y Vallander y Eriksson, 1990, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

Sacarificación

En la etapa de sacarificación (es decir, la etapa de hidrólisis), el material celulósico, por ejemplo pretratado, se hidroliza para romper la celulosa y/o hemicelulosa en azúcares fermentables, tales como glucosa, celobiosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, manosa, galactosa, y/u oligosacáridos solubles. La hidrólisis se realiza enzimáticamente mediante una composición de enzima celulolítica. Las enzimas de las composiciones se pueden añadir de forma simultánea o secuencial.

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo preferiblemente en un entorno acuoso adecuado en condiciones que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. En un aspecto, la hidrólisis se realiza en condiciones adecuadas para la actividad de la(s) enzima(s), es decir, óptimas para la(s) enzima(s). La hidrólisis se puede llevar a cabo como un procedimiento alimentado por lotes o continuo, en el que el material celulósico se alimenta gradualmente a, por ejemplo, una disolución de hidrólisis que contiene enzima.

La sacarificación se realiza generalmente en reactores de tanque agitado o fermentadores bajo condiciones controladas de pH, temperatura, y mezclado. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente el tiempo de procedimiento, la temperatura, y las condiciones de pH adecuados. Por ejemplo, la sacarificación puede durar hasta 200 horas, pero típicamente se realiza durante preferiblemente alrededor de 12 a alrededor de 120 horas, por ejemplo alrededor de 16 a alrededor de 72 horas, o alrededor de 24 a alrededor de 48 horas. La temperatura está en el intervalo de preferiblemente alrededor de 25°C a alrededor de 70°C, por ejemplo alrededor de 30°C a alrededor de 65°C, alrededor de 40°C a alrededor de 60°C, o alrededor de 50°C a alrededor de 55°C. El pH está en el intervalo de preferiblemente alrededor de 3 a alrededor de 8, por ejemplo alrededor de 3,5 a alrededor de 7, alrededor de 4 a alrededor de 6, o alrededor de 4,5 a alrededor de 5,5. El contenido de sólidos secos está en el intervalo de preferiblemente alrededor de 5 a alrededor de 50% en peso, por ejemplo alrededor de 10 a alrededor de 40% en peso, o alrededor de 20 a alrededor de 30% en peso.

La sacarificación en la etapa (a) se lleva a cabo usando una composición de enzima celulolítica. Tales composiciones enzimáticas se describen a continuación en la sección “Composición de enzima celulolítica” más abajo. Las composiciones de enzima celulolítica pueden comprender cualquier proteína útil para degradar el material celulósico. En un aspecto, la composición de enzima celulolítica comprende o comprende además una o más (por ejemplo, varias)

proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, un polipéptido AA9 (GH61), una hemicelulasa, una esterasa, una expansina, una enzima ligninolítica, una oxidorreductasa, una pectinasa, una proteasa, y una swollenina.

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

En otro aspecto, la hemicelulasa es preferiblemente una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una acetilmanano esterasa, una acetilxilano esterasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una glucuronoil esterasa, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa. En otro aspecto, la oxidorreductasa es preferiblemente una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una catalasa, una lacasa, y una peroxidasa.

Las enzimas o composiciones enzimáticas utilizadas en los procedimientos de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para uso, tal como, por ejemplo, una formulación de caldo de fermentación o una composición celular, un lisado celular con o sin detritos celulares, una preparación enzimática semipurificada o purificada, o una célula hospedante como fuente de las enzimas. La composición enzimática puede ser un polvo o granulado seco, un granulado que no espolvorea, un líquido, un líquido estabilizado o una enzima protegida estabilizada. Las preparaciones enzimáticas líquidas se pueden estabilizar, por ejemplo, mediante la adición de estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico, según procedimientos establecidos.

En un aspecto, una cantidad eficaz de composición de enzima celulolítica o hemicelulolítica para el material celulósico es alrededor de 0,5 a alrededor de 50 mg, por ejemplo alrededor de 0,5 a alrededor de 40 mg, alrededor de 0,5 a alrededor de 25 mg, alrededor de 0,75 a alrededor de 20 mg, alrededor de 0,75 a alrededor de 15 mg, alrededor de 0,5 a alrededor de 10 mg, o alrededor de 2,5 a alrededor de 10 mg por g del material celulósico.

En un aspecto, dicho compuesto se añade en una relación molar del compuesto a unidades glucosílicas de celulosa de alrededor de 10^{-6} a alrededor de 10, por ejemplo alrededor de 10^{-6} a alrededor de 7,5, alrededor de 10^{-6} a alrededor de 5, alrededor de 10^{-6} a alrededor de 2,5, alrededor de 10^{-6} a alrededor de 1, alrededor de 10^{-5} a alrededor de 1, alrededor de 10^{-5} a alrededor de 10^{-1} , alrededor de 10^{-4} a alrededor de 10^{-1} , alrededor de 10^{-3} a alrededor de 10^{-1} , o alrededor de 10^{-3} a alrededor de 10^{-2} . En otro aspecto, una cantidad eficaz de dicho compuesto es alrededor de 0,1 μM a alrededor de 1 M, por ejemplo alrededor de 0,5 μM a alrededor de 0,75 M, alrededor de 0,75 μM a alrededor de 0,5 M, alrededor de 1 μM a alrededor de 0,25 M, alrededor de 1 μM a alrededor de alrededor de 0,1 M, alrededor de 5 μM a alrededor de 50 mM, alrededor de 10 μM a alrededor de 25 mM, alrededor de 50 μM a alrededor de 25 mM, alrededor de 10 μM a alrededor de 10 mM, alrededor de 5 μM a alrededor de 5 mM, o alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM.

El término "licor" significa la fase de disolución, ya sea acuosa, orgánica, o una combinación de las mismas, que surge del tratamiento de un material de lignocelulosa y/o hemicelulosa en una suspensión, o sus monosacáridos, por ejemplo xilosa, arabinosa, manosa, etc., en condiciones como se describen en el documento WO 2012/021401, y sus contenidos solubles. Un licor para la mejora celulolítica de un polipéptido AA9 (polipéptido GH61) se puede producir tratando un material (o materia prima) de lignocelulosa o hemicelulosa aplicando calor y/o presión, opcionalmente en presencia de un catalizador, por ejemplo ácido, opcionalmente en presencia de un disolvente orgánico, y opcionalmente en combinación con la rotura física del material, y después separando la disolución de los sólidos residuales. Dichas condiciones determinan el grado de mejora celulolítica que se puede obtener mediante la combinación de licor y un polipéptido AA9 durante la hidrólisis de un sustrato celulósico mediante una preparación de enzima celulolítica. El licor se puede separar del material tratado usando un método estándar en la técnica, tal como filtración, sedimentación, o centrifugación.

En un aspecto, una cantidad eficaz del licor a celulosa es alrededor de 10^{-6} a 10 g por g de celulosa, por ejemplo alrededor de 10^{-6} a alrededor de 7,5 g, alrededor de 10^{-6} a alrededor de 5 g, alrededor de 10^{-6} a alrededor de 2,5 g, alrededor de 10^{-6} a alrededor de 1 g, alrededor de 10^{-5} a alrededor de 1 g, alrededor de 10^{-5} a alrededor de 10^{-1} g, alrededor de 10^{-4} a alrededor de 10^{-1} g, alrededor de 10^{-3} a alrededor de 10^{-1} g, o alrededor de 10^{-3} a alrededor de 10^{-2} g por g de celulosa.

Fermentación

Los azúcares fermentables obtenidos del material celulósico hidrolizado se pueden fermentar por uno o más (por ejemplo, varios) microorganismos fermentadores capaces de fermentar los azúcares directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado. "Fermentación" o "procedimiento de fermentación" se refiere a cualquier procedimiento de fermentación o cualquier procedimiento que comprenda una etapa de fermentación. Los procedimientos de fermentación también incluyen los procedimientos de fermentación utilizados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero, y la industria del tabaco. Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y del organismo de fermentación, y un experto en la técnica puede determinarlas fácilmente.

En la etapa de fermentación, los azúcares, liberados del material celulósico como resultado de las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática, se fermentan a un producto, por ejemplo etanol, por un organismo fermentador, tal como la levadura. La hidrólisis (sacarificación) y la fermentación pueden ser separadas o simultáneas.

Al poner en práctica la presente invención, en la etapa de fermentación se puede usar cualquier material celulósico hidrolizado adecuado. El material se selecciona generalmente en base a la economía, es decir, los costes por potencial de azúcar equivalente, y la resistencia a la conversión enzimática.

La expresión "medio de fermentación" se entiende en el presente documento que se refiere a un medio antes de que se añada(n) microorganismo(s) fermentador(es), tal como un medio resultante de un procedimiento de sacarificación, así como un medio utilizado en un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

Organismo fermentador de la invención

En este aspecto, la invención se refiere a organismos fermentadores recombinantes capaces de convertir hexosas y pentosas en etanol, y en la que el organismo fermentador recombinante es *Saccharomyces cerevisiae* CIBTS1260 (depositado con el número de acceso NRRL Y-50973 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Illinois 61604 U.S.A.).

Saccharomyces cerevisiae CIBTS1260 tiene una o más, tal como todas, de las siguientes propiedades:

- mayor consumo de xilosa en comparación con BSGX001 después de 48 horas de fermentación a 1 g de DWC/l, 35°C, pH 5,5, en particular como se describe en el Ejemplo 3;
- mayor consumo de glucosa en comparación con BSGX001 después de 48 horas de fermentación a 1 g de DWC/l, 35°C, pH 5,5, en particular como se describe en el Ejemplo 3;
- mayor producción de etanol en comparación con BSGX001 después de 48 horas de fermentación a 1 g de DWC/l, 35°C, pH 5,5, en particular como se describe en el Ejemplo 3.

Saccharomyces cerevisiae CIBTS1260 proporciona un consumo total de xilosa a las 48 horas de fermentación en las condiciones del procedimiento en el Ejemplo 3, es decir, 1 g de DCW/l, 35°C, pH 5,5.

Saccharomyces cerevisiae CIBTS1260 proporciona un consumo total de glucosa a las 24 horas de fermentación en las condiciones del procedimiento en el Ejemplo 3, es decir, 1 g de DCW/l, 35°C, pH 5,5.

Saccharomyces cerevisiae CIBTS1260 proporciona más de 30 g/l de etanol, tal como más de 40 g/l de etanol, tal como más de 45 g/l de etanol, tal como aproximadamente 47 g/l de etanol después de 48 horas de fermentación en las condiciones del procedimiento en el Ejemplo 3, es decir, 1 g de DCW/l, 35°C, pH 5,5.

El organismo fermentador de la invención comprende un gen que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene actividad de xilosa isomerasa mostrada en SEQ ID NO: 2 en el documento US 8586336B2 o SEQ ID NO: 13 aquí.

El organismo fermentador de la invención comprende un gen transportador de pentosa, GFX1 de *Candida intermedia*, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 18.

El organismo fermentador de la invención sobreexpresa un gen de xiluloquinasa (XKS) de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*.

El organismo fermentador de la invención sobreexpresa un gen de ribulosa 5 fosfato 3-epimerasa (RPE1) de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*.

El organismo fermentador de la invención sobreexpresa un gen de ribulosa 5 fosfato isomerasa (RKI1) de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*.

El organismo fermentador de la invención sobreexpresa un gen de transcetolasa (TKL1) y sobreexpresa un gen de transaldolasa (TAL1) de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*.

El organismo fermentador de la invención tiene todas las siguientes modificaciones genéticas:

- gen de xilosa isomerasa (Ru-XI) obtenido a partir del fluido del rumen bovino, mostrado en SEC ID NO: 20 aquí, que codifica la xilosa isomerasa mostrada en SEC ID NO: 13 aquí;
- un gen transportador de pentosa (GXF1) de *Candida intermedia*, mostrado en SEQ ID NO: 18;

- gen de la xiluloquinasa (XKS), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*;
- gen de la ribulosa 5 fosfato 3-epimerasa (RPE1), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*;
- gen de la ribulosa 5 fosfato isomerasa (RKI1), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*;
- gen de transcetolasa (TKL1) y gen de transaldolasa (TAL1), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*.

El organismo fermentador de la invención tiene las siguientes modificaciones genéticas:

- gen de xilosa isomerasa (Ru-XI) obtenido a partir del fluido del rumen bovino, mostrado en SEC ID NO: 20 aquí, que codifica la xilosa isomerasa mostrada en SEC ID NO: 13 aquí;
- gen de la xiluloquinasa (XKS), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*;
- gen de la ribulosa 5 fosfato 3-epimerasa (RPE1), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*;
- gen de la ribulosa 5 fosfato isomerasa (RKI1), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*;
- gen de transcetolasa (TKL1) y gen de transaldolasa (TAL1), de una cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estimuladores de la fermentación

Un estimulador de la fermentación se puede usar en un procedimiento de la invención descrito aquí para mejorar aún más la fermentación, y en particular, el rendimiento del organismo fermentador, tal como la mejora de la velocidad y el rendimiento del producto (por ejemplo, rendimiento de etanol). Un “estimulador de la fermentación” se refiere a estimuladores para el crecimiento de los organismos fermentadores, en particular, levadura. Los estimuladores de la fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, mesoinositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, riboflavina, y vitaminas A, B, C, D, y E. Véase, por ejemplo, Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002). Los ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes, que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, y Cu.

Productos de fermentación

El producto de fermentación de la invención es etanol.

Recuperación

El producto de fermentación, es decir, etanol, puede recuperarse opcionalmente del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación, o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material celulósico fermentado y se purifica mediante métodos convencionales de destilación. Se puede obtener etanol con una pureza de hasta alrededor de 96% en volumen, que se puede usar como, por ejemplo, etanol de combustible, etanol para bebida, es decir, alcoholes neutros potables, o etanol industrial.

ENZIMAS

Las siguientes secciones describen polipéptidos, enzimas y composición de enzimas que pueden usarse en los procedimientos de la invención.

Composición de enzima celulolítica

Según la invención, una composición de enzima celulolítica está presente o se añade durante la sacarificación en la etapa (a). Una composición de enzima celulolítica es una preparación de enzima que contiene una o más (por ejemplo, varias) enzimas que hidrolizan el material celulósico. Tales enzimas incluyen endoglucanasa, celobiohidrolasa, beta-glucosidasa, y/o combinaciones de las mismas.

La composición de enzima celulolítica puede ser de cualquier origen. En una realización, la composición de enzima celulolítica deriva de una cepa de *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa de *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*, y/o una cepa de *Chrysosporium*, tal como una cepa de *Chrysosporium lucknowense*. En una realización preferida, la preparación de enzima celulolítica deriva de una cepa de *Trichoderma reesei*.

La composición de enzima celulolítica puede comprender además uno o más de los siguientes polipéptidos, tales como enzimas: polipéptido AA9 (polipéptido GH61) que tiene actividad potenciadora celulolítica, beta-glucosidasa, xilanasa, beta-xilosidasa, CBH I, CBH II, o una mezcla de dos, tres, cuatro, cinco o seis de ellos.

El o los polipéptidos (por ejemplo, polipéptido AA9) y/o la o las enzimas (por ejemplo, beta-glucosidasa, xilanasa, beta-xilosidasa, CBH I y/o CBH II) adicionales pueden ser extraños al organismo productor de la composición de enzima celulolítica (por ejemplo, *Trichoderma reesei*).

En una realización, la preparación de enzima celulolítica comprende un polipéptido AA9 que tiene actividad potenciadora celulolítica y una beta-glucosidasa.

En otra realización, la preparación de enzima celulolítica comprende un polipéptido AA9 que tiene actividad potenciadora celulolítica, una beta-glucosidasa, y una CBH I.

En otra realización, la preparación de enzima celulolítica comprende un polipéptido AA9 que tiene actividad potenciadora celulolítica, una beta-glucosidasa, una CBH I y una CBH II.

Otras enzimas, tales como endoglucanasas, también pueden estar incluidas en la composición de enzima celulolítica.

Como se mencionó anteriormente, la composición de enzima celulolítica puede comprender varios polipéptidos diferentes, que incluyen enzimas.

En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad potenciadora celulolítica (por ejemplo, documento WO 2005/074656), y proteína de fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (por ejemplo, la descrita en el documento WO 2008/057637, en particular mostrada como SEQ ID NOs: 59 and 60).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad potenciadora celulolítica (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2005/074656 o SEQ ID NO: 4 aquí), y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Penicillium emersonii* que tiene actividad potenciadora celulolítica, en particular el descrito en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí, y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Penicillium emersonii* que tiene actividad potenciadora celulolítica, en particular el descrito en el documento WO 2011/041397, y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí) o una variante descrita en el documento WO 2012/044915, en particular aquella que comprende una o más, tales como todas, de las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y.

En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además un polipéptido AA9 (GH61A) que tiene actividad potenciadora celulolítica, en particular el derivado de una cepa de *Penicillium emersonii* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí), beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí) o una variante con una o más, en particular todas, de las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y, y descrita en el documento WO 2012/044915; CBH1 Cel7A de *Aspergillus fumigatus*, por ejemplo la descrita como SEQ ID NO: 6 en el documento WO2011/057140 y SEQ ID NO: 10 aquí, y CBH II de *Aspergillus fumigatus*, por ejemplo la descrita como SEQ ID NO: 18 en el documento WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 11 aquí.

En una realización preferida, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además una hemicelulasa, o una composición de enzima hemicelulolítica, tal como una xilanasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 8 aquí) y beta-xilosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 9 aquí).

En una realización, la composición de enzima celulolítica también comprende una xilanasa (por ejemplo, derivada de una cepa del género *Aspergillus*, en particular *Aspergillus aculeatus* o *Aspergillus fumigatus*; o una cepa del género *Talaromyces*, en particular *Talaromyces leycettanus*) y/o una beta-xilosidasa (por ejemplo, derivada de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus fumigatus*, o una cepa de *Talaromyces*, en particular *Talaromyces emersonii*).

En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad potenciadora celulolítica (por ejemplo, documento WO 2005/074656 o SEQ ID NO: 4 aquí), proteína de fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (por ejemplo, la descrita en el documento WO 2008/057637, en particular como SEQ ID NOs: 59 y 60), y xilanasa de *Aspergillus aculeatus* (por ejemplo, Xyl II en el documento WO 94/21785 o SEQ ID NO: 6 aquí).

En otra realización, la preparación de enzima celulolítica comprende una preparación celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad potenciadora celulolítica (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2005/074656 o SEQ ID NO: 4 aquí), beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí) y xilanasa de *Aspergillus aculeatus* (Xyl II descrita en el documento WO 94/21785 o SEQ ID NO: 6 aquí).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica comprende una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad potenciadora celulolítica (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2005/074656 o SEQ ID NO: 4 aquí), beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí) y xilanasa de *Aspergillus aculeatus* (por ejemplo, Xyl II descrita en el documento WO 94/21785 o SEQ ID NO: 6 aquí).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Penicillium emersonii* que tiene actividad potenciadora celulolítica, en particular el descrito en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí, beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí) y xilanasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, Xyl III en el documento WO 2006/078256 o SEQ ID NO: 8 aquí).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica comprende una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Penicillium emersonii* que tiene actividad potenciadora celulolítica, en particular el descrito en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí, beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí), xilanasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, Xyl III en el documento WO 2006/078256 o SEQ ID NO: 8 aquí), y CBH I de *Aspergillus fumigatus*, en particular CBH1 Cel7A descrita como SEQ ID NO: 2 en WO2011/057140 o SEQ ID NO: 10 aquí.

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Penicillium emersonii* que tiene actividad potenciadora celulolítica, en particular el descrito en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí, beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí), xilanasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, Xyl III en el documento WO 2006/078256 o SEQ ID NO: 8 aquí), CBH I de *Aspergillus fumigatus*, en particular CBH1 Cel7A descrita como SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 10 aquí, y CBH II derivada de *Aspergillus fumigatus*, en particular la descrita como SEQ ID NO: 4 en el documento WO 2013/028928 o SEQ ID NO: 11 aquí.

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además polipéptido AA9 (GH61A) de *Penicillium emersonii* que tiene actividad potenciadora celulolítica, en particular el descrito en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí, beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí), o una variante de la misma con una o más, en particular todas, de las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y; xilanasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, Xyl III en el documento WO 2006/078256 o SEQ ID NO: 8 aquí), CBH I de *Aspergillus fumigatus*, en particular CBH I Cel7A descrita como SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 10 aquí, y CBH II derivada de *Aspergillus fumigatus*, en particular la descrita en el documento WO 2013/028928 o SEQ ID NO: 11 aquí.

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende la CBH I de SEQ ID NO: 14 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49536 (documento WO2012/103293)); una CBH II de SEQ ID NO: 15 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49446 (documento WO2012/103288)); una variante de beta-glucosidasa de SEQ ID NO: 5 aquí (No. de acceso GENSEQP AZU67153 (documento WO 2012/44915)), en particular con una o más, en particular todas, de las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y; y AA9 (polipéptido GH61) de SEQ ID NO: 7 aquí (No. de acceso GENSEQP BAL61510 (documento WO 2013/028912)).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende la CBH I de SEQ ID NO: 14 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49536 (documento WO2012/103293)); la CBH II de SEQ ID NO: 15 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49446 (documento WO2012/103288)); la xilanasa GH10 de SEQ ID NO: 16 aquí (No. de acceso GENSEQP BAK46118 (documento WO

2013/019827)); y la beta-xilosidasa de SEQ ID NO: 17 aquí (No. de acceso GENSEQP AZI04896 (documento WO 2011/057140)).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende la CBH I de SEQ ID NO: 14 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49536 (documento WO2012/103293)); la CBH II de SEQ ID NO: 15 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49446 (documento WO2012/103288)); y el AA9 (polipéptido GH61) de SEQ ID NO: 7 aquí (No. de acceso GENSEQP BAL61510 (documento WO 2013/028912)).

En otra realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende la CBH I de SEQ ID NO: 14 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49536 (documento WO2012/103293)); la CBH II de SEQ ID NO: 15 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49446 (documento WO2012/103288)), el AA9 (polipéptido GH61) de SEQ ID NO: 7 aquí (No. de acceso GENSEQP BAL61510 (documento WO 2013/028912)), y la catalasa de SEQ ID NO: 19 aquí (No. de acceso GENSEQP BAC11005 (documento WO 2012/130120)).

En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende la CBH I de SEQ ID NO: 14 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49446 (documento WO2012/103288)); la CBH II de SEQ ID NO: 15 aquí (No. de acceso GENSEQP AZY49446 (documento WO2012/103288)), la variante de beta-glucosidasa de SEQ ID NO: 5 aquí (No. de acceso GENSEQP AZU67153 (documento WO 2012/44915)), con una o más, en particular todas, de las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y; el AA9 (polipéptido GH61) de SEQ ID NO: 7 aquí (No. de acceso GENSEQP BAL61510 (documento WO 2013/028912)), la xilanasa GH10 de SEQ ID NO: 16 aquí (No. de acceso GENSEQP BAK46118 (documento WO 2013/019827)), y la beta-xilosidasa de SEQ ID NO: 17 aquí (No. de acceso GENSEQP AZI04896 (documento WO 2011/057140)).

En una realización, la composición celulolítica es una preparación de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende EG I de SEQ ID NO: 21 aquí (No. de acceso Swissprot P07981), EG II de SEQ ID NO: 22 aquí (No. de acceso EMBL M19373), CBH I de SEQ ID NO: 14 aquí; CBH II de SEQ ID NO: 15 aquí; variante de beta-glucosidasa de SEQ ID NO: 5 aquí, con las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y; el AA9 (polipéptido GH61) de SEQ ID NO: 7 aquí, xilanasa GH10 de SEQ ID NO: 16 aquí; y beta-xilosidasa de SEQ ID NO: 17 aquí.

La composición de enzima celulolítica comprende o puede comprender además una o más (varias) proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, un polipéptido AA9 (es decir, GH61) que tiene actividad potenciadora celulolítica, una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica comercial. Ejemplos de composiciones de enzima celulolítica comerciales adecuadas para uso en un procedimiento de la invención incluyen: CELLIC® CTec (Novozymes A/S), CELLIC® CTec2 (Novozymes A/S), CELLIC® CTec3 (Novozymes A/S), CELLUCLAST™ (Novozymes A/S), SPEZYME™ CP (Genencor Int.), ACCELLERASE™ 1000, ACCELLERASE™ 1500, ACCELLERASE™ TRIO (DuPont), FILTRASE® NL (DSM); METHAPLUS® S/L 100 (DSM), ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH), or ALTERNAFUEL® CMAX3™ (Dyadic International, Inc.). La composición de enzima celulolítica se puede añadir en una cantidad eficaz de alrededor de 0,001 a alrededor de 5,0% en peso de sólidos, por ejemplo alrededor de 0,025 a alrededor de 4,0% en peso de sólidos, o alrededor de 0,005 a alrededor de 2,0% en peso de sólidos.

Endoglucanasa

La composición de enzima celulolítica usada en un procedimiento de la invención puede comprender una endoglucanasa de cualquier origen.

Los ejemplos de endoglucanasas bacterianas que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* (documentos WO 91/05039; WO 93/15186; Patente U.S. No. 5.275.944; WO 96/02551; Patente U.S. No. 5.536.655; WO 00/70031; WO 05/093050), endoglucanasa de *Erwinia carotovora* (Saarilahti et al., 1990, Gene 90: 9-14), endoglucanasa III de *Thermobifida fusca* (documento WO 05/093050), y endoglucanasa V de *Thermobifida fusca* (documento WO 05/093050).

Los ejemplos de endoglucanasas fúngicas que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (Penttilä et al., 1986, Gene 45: 253-263, endoglucanasa I Cel7B de *Trichoderma reesei* (GenBank: M15665), endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 1988, Gene 63:11-22), endoglucanasa II Cel5A de *Trichoderma reesei* (GenBank: M19373), endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* (Okada et al., 1988, Appl. Environ. Microbiol. 64: 555-563, GenBank:AB003694), endoglucanasa V de *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 1994, Molecular Microbiology 13: 219-228, GenBank:Z33381), endoglucanasa de *Aspergillus aculeatus* (Ooi et al., 1990, Nucleic Acids Research 18: 5884), endoglucanasa de *Aspergillus kawachii* (Sakamoto et al., 1995, Current Genetics 27: 435-439), endoglucanasa de *Fusarium oxysporum* (GenBank: L29381),

endoglucanasa de *Humicola grisea* var. *termoidea* (GenBank: AB003107), endoglucanasa de *Melanocarpus albomyces* (GenBank: MAL515703), endoglucanasa de *Neurospora crassa* (GenBank: XM_324477), endoglucanasa V de *Humicola insolens*, endoglucanasa de *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, endoglucanasa I de *Thermoascus aurantiacus* (GenBank: AF487830), endoglucanasa de *Trichoderma reesei* cepa No. VTT-D-80133 (GenBank: M15665), endoglucanasa de *Penicillium pinophilum* (documento WO 2012/062220); y (documento WO 2013/019780).

En una realización, la endoglucanasa, tal como la derivada de *Trichoderma reesei* u homólogo de la misma, se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una endoglucanasa (EG) que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 21 aquí;

(ii) una endoglucanasa (EG) que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 21 aquí.

En una realización, la endoglucanasa, tal como la derivada de *Trichoderma reesei* u homólogo de la misma, se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una endoglucanasa (EG) que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 22 aquí;

(ii) una endoglucanasa (EG) que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 22 aquí.

Polipéptido AA9 (es decir, GH61) que tiene actividad potenciadora celulolítica

La composición de enzima celulolítica utilizada según la invención puede comprender en una realización uno o más polipéptidos AA9 (GH61) que tienen actividad potenciadora celulolítica. La composición de enzima celulolítica usada en un procedimiento de la invención puede comprender un polipéptido AA9 (GH61) de cualquier origen.

Ejemplos de polipéptidos AA9 útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos AA9 de *Thielavia terrestris* (documentos WO 2005/074647, WO 2008/148131, y WO 2011/035027), *Thermoascus aurantiacus* (documentos WO 2005/074656 y WO 2010/065830), *Trichoderma reesei* (documentos WO 2007/089290 y WO 2012/149344), *Myceliophthora thermophila* (documentos WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868, y WO 2009/033071), *Aspergillus fumigatus* (documento WO 2010/138754), *Penicillium pinophilum* (documento WO 2011/005867), *Thermoascus* sp. (documento WO 2011/039319), *Penicillium* sp. (*emersonii*) (documentos WO 2011/041397 y WO 2012/000892), *Thermoascus crustaceus* (documento WO 2011/041504), *Aspergillus aculeatus* (documento WO 2012/125925), *Thermomyces lanuginosus* (documentos WO 2012/113340, WO 2012/129699, WO 2012/130964, y WO 2012/129699), *Aurantiporus alborubescens* (documento WO 2012/122477), *Trichophaea saccata* (documento WO 2012/122477), *Penicillium thomii* (documento WO 2012/122477), *Talaromyces stipitatus* (documento WO 2012/135659), *Humicola insolens* (documento WO 2012/146171), *Malbranchea cinnamomea* (documento WO 2012/101206), *Talaromyces leycettanus* (documento WO 2012/101206), and *Chaetomium thermophilum* (documento WO 2012/101206), y *Talaromyces thermophilus* (documentos WO 2012/129697 y WO 2012/130950).

En un aspecto, el polipéptido AA9 se usa en presencia de un catión de metal divalente activante soluble según el documento WO 2008/151043, por ejemplo manganeso o cobre.

En otro aspecto, el polipéptido AA9 se usa en presencia de un compuesto dioxi, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto que contiene nitrógeno, un compuesto de quinona, un compuesto que contiene azufre, o un licor obtenido a partir de un material celulósico pretratado, tal como el rastrojo de maíz pretratado (documentos WO 2012/021394, WO 2012/021395, WO 2012/021396, WO 2012/021399, WO 2012/021400, WO 2012/021401, WO 2012/021408, y WO 2012/021410).

En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende un polipéptido AA9 (GH61) que tiene actividad potenciadora celulolítica, tal como el derivado del género *Thermoascus*, tal como una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, tal como el descrito en el documento WO 2005/074656 como SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 aquí; o el derivado del género *Thielavia*, tal como una cepa de *Thielavia terrestris*, tal como el descrito en el documento WO 2005/074647 como SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 2 aquí; o el derivado de una cepa de *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como el descrito en el documento WO 2010/138754 como SEQ ID NO: 2; o el derivado de una cepa derivada de *Penicillium*, tal como una cepa de *Penicillium emersonii*, tal como el descrito en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí.

En una realización, el polipéptido AA9 (GH61) de *Thermoascus aurantiacus* que tiene actividad potenciadora celulolítica, u homólogo del mismo, se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 aquí;
- (ii) un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 aquí.

En otra realización el polipéptido AA9 (GH61) de *Penicillium* sp. que tiene actividad potenciadora celulolítica, u homólogo del mismo, se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 7 aquí;
- (ii) un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 7 aquí.

Beta-glucosidasa

Según la invención, puede estar presente y/o añadirse una beta-glucosidasa en la etapa de sacarificación (a). La composición de enzima celulolítica usada en un procedimiento de la invención puede comprender una beta-glucosidasa de cualquier origen.

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

En una realización, la beta-glucosidasa puede ser la derivada de una cepa del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*, tal como la descrita en el documento WO 2002/095014 o la proteína de fusión que tiene actividad de beta-glucosidasa descrita en el documento WO 2008/057637 como SEQ ID NOS: 59 y 60, o *Aspergillus fumigatus*, tal como la descrita en el documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí, o una variante de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*, tal como la descrita en el documento WO 2012/044915, tal como una con las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y (usando, para la numeración, SEQ ID NO: 5 aquí).

En otra realización, la beta-glucosidasa deriva de una cepa del género *Penicillium*, tal como una cepa de *Penicillium brasilianum* descrita en el documento WO 2007/019442, o una cepa del género *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*.

En una realización, la beta-glucosidasa es una beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*, u homólogo de la misma, seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) una beta-glucosidasa que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 aquí;
- (ii) una beta-glucosidasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 aquí.

En una realización, la beta-glucosidasa es una variante que comprende una sustitución en una o más (varias) posiciones correspondientes a las posiciones 100, 283, 456 y 512 del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 aquí, en la que la variante tiene actividad de beta-glucosidasa.

En una realización, la beta-glucosidasa es una variante de (a) un polipéptido que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 aquí; (b) un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 aquí; o (c) un fragmento del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 aquí, que tiene actividad de beta-glucosidasa.

En una realización, la variante de beta-glucosidasa tiene al menos 80%, por ejemplo al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 aquí.

En una realización, la beta-glucosidasa es de una cepa de *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, mostrada en SEQ ID NO: 5 aquí), que comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en L89M, G91L, F100D, I140V, I186V, S283G, N456E y F512Y; tal como una variante de la misma con las siguientes sustituciones:

- F100D + S283G + N456E + F512Y;
- L89M + G91L + I186V + I140V;
- I186V + L89M + G91L + I140V + F100D + S283G + N456E + F512Y.

En una realización, el número de sustituciones está entre 1 y 10, tal como 1 y 8, tal como 1 y 6, tal como 1 y 4, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones.

En una realización, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 100, una sustitución en una posición correspondiente a la posición 283, una sustitución en una posición correspondiente a la posición 456, y/o una sustitución en una posición correspondiente a la posición 512.

En una realización preferida, la variante de beta-glucosidasa comprende las siguientes sustituciones: Phe100Asp, Ser283Gly, Asn456Glu, Phe512Tyr en la SEQ ID NO: 5 aquí.

Celobiohidrolasa

La composición de enzima celulolítica usada en un procedimiento de la invención puede comprender una celobiohidrolasa, tal como CBH I y/o CBH II, de cualquier origen.

Los ejemplos de celobiohidrolasas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, *Aspergillus aculeatus* cellobiohydrolase II (documento WO 2011/059740), *Aspergillus fumigatus* cellobiohydrolase I (documento WO 2013/028928), *Aspergillus fumigatus* cellobiohydrolase II (documento WO 2013/028928), *Chaetomium thermophilum* cellobiohydrolase I, *Chaetomium thermophilum* cellobiohydrolase II, *Humicola insolens* cellobiohydrolase I, *Myceliophthora thermophila* cellobiohydrolase II (documento WO 2009/042871), *Penicillium occitanis* cellobiohydrolase I (GenBank:AY690482), *Talaromyces emersonii* cellobiohydrolase I (GenBank:AF439936), *Thielavia hyrcanie* cellobiohydrolase II (documento WO 2010/141325), *Thielavia terrestris* cellobiohydrolase II (CEL6A, WO 2006/074435), *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I, *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II, and *Trichophaea saccata* cellobiohydrolase II (documento WO 2010/057086). Celobiohidrolasa I.

Celobiohidrolasa I

La composición de enzima celulolítica usada en un procedimiento de la invención puede comprender en una realización una o más CBH I (celobiohidrolasa I). En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende una celobiohidrolasa I (CBH I), tal como la derivada de una cepa del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como la CBH I Cel7A descrita en SEQ ID NO: 6 en el documento WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 10 aquí; una cepa del género *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*; o una cepa del género *Talaromyces*, tal como una cepa de *Talaromyces leycettanus*, preferiblemente la mostrada en SEQ ID NO: 14 aquí o No. de acceso GENSEQP AZY49536 (documento WO2012/103293).

En una realización, la celobiohidrolasa I de *Aspergillus fumigatus*, u homólogo de la misma, se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una celobiohidrolasa I que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 10 aquí;
- (ii) una celobiohidrolasa I que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 10 aquí.

En otra realización, la celobiohidrolasa I, por ejemplo la derivada de una cepa de *Talaromyces leycettanus*, se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una celobiohidrolasa I que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 14 aquí;

- (ii) una celobiohidrolasa I que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 14 aquí.

Celobiohidrolasa II

La composición de enzima celulolítica usada según la invención puede comprender en una realización una o más CBH II (celobiohidrolasa II). En una realización, la celobiohidrolasa II (CBHII), tal como la derivada de una cepa del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como la de SEQ ID NO: 11 aquí, o una cepa del género *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*, o una cepa del género *Thielavia*, tal como una cepa de *Thielavia terrestris*, tal como la celobiohidrolasa II CEL6A de *Thielavia terrestris*; o una cepa del género *Talaromyces*, tal como una cepa de *Talaromyces leycettanus*, preferiblemente la mostrada en SEQ ID NO: 15 aquí o No. de acceso GENSEQP AZY49446 (documento WO2012/103288).

En una realización, la celobiohidrolasa II de *Aspergillus fumigatus*, u homólogo de la misma, se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una celobiohidrolasa II que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 11 aquí;
- (ii) una celobiohidrolasa II que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 11 aquí.

En otra realización, la celobiohidrolasa II, por ejemplo la derivada de una cepa de *Talaromyces leycettanus*, se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) una celobiohidrolasa II que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 15 aquí;
- (ii) una celobiohidrolasa II que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 15 aquí.

Hemicelulasas

Según la invención, puede estar presente y/o añadirse una hemicelulasa durante la sacarificación en la etapa (a). La hemicelulasa puede estar en forma de una composición de enzima hemicelulolítica. La hemicelulasa puede ser de cualquier origen, pero preferiblemente de origen fúngico o bacteriano.

El término "hemicelulasa" o "enzima hemicelulolítica" significa una o más (varias) enzimas que hidrolizan un material hemicelulósico. Véase, por ejemplo, Shallom y Shoham, 2003, Microbial hemicellulases. Current Opinion In Microbiology, 6(3): 219-228. Las hemicelulasas son componentes clave en la degradación de la biomasa vegetal. Ejemplos de hemicelulasas incluyen, pero no se limitan a, una acetilmanano esterasa, una acetilxilano esterasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una glucuronil esterasa, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa. Los módulos catalíticos de las hemicelulasas son glucósido hidrolasas (GH) que hidrolizan enlaces glucosídicos, o carbohidrato esterasas (CE), que hidrolizan enlaces de éster de acetato o de grupos laterales de ácido ferúlico. Estos módulos catalíticos, basados en la homología de su secuencia primaria, pueden asignarse a familias de GH y CE marcadas con números. Algunas familias, con un pliegue general similar, se pueden agrupar además en clanes, marcados alfabéticamente (por ejemplo, GH-A). Una clasificación más informativa y actualizada de estas y otras enzimas activas de hidratos de carbono está disponible en la base de datos de enzimas activas de hidratos de carbono (CAZy). Las actividades de las enzimas hemicelulolíticas se pueden medir según Ghose y Bisaria, 1987, Pure & Appl. Chem. 59: 1739-1752.

En una realización, la hemicelulasa presente y/o añadida en la sacarificación es una composición de enzima hemicelulolítica. En una realización, la composición de enzima hemicelulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además una xilanasa y/o una beta-xilosidasa. En una realización preferida, la composición de enzima hemicelulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además xilanasa de *Aspergillus fumigatus* (XYL III mostrada en SEQ ID NO: 8 aquí) y beta-xilosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 9 aquí).

La hemicelulasa o preparación de enzima hemicelulolítica se puede añadir preferiblemente en concentraciones entre 0,01 y 20 mg de EP/g de celulosa, tal como 0,1-1 mg de EP/g de celulosa.

Xilanasas

En una realización preferida, la hemicelulasa es una xilanasas, o la composición de enzima hemicelulolítica comprende una xilanasas. El término "xilanasas" significa una 1,4-beta-D-xilano-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos. Para los fines de la presente invención, la actividad de xilanasas se determina con AZCL-arabinoxilano al 0,2% como sustrato en TRITON® X-100 al 0,01% y amortiguador de fosfato sódico 200 mM pH 6 a 37°C. Una unidad de actividad de xilanasas se define como 1,0 µmol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6, a partir de AZCL-arabinoxilano al 0,2% como sustrato en amortiguador de fosfato sódico 200 mM pH 6.

Los ejemplos de xilanasas útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP:AAR63790; documento WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* (documento WO 2006/078256), *Penicillium pinophilum* (documento WO 2011/041405), *Penicillium* sp. (Documento WO 2010/126772), *Thermomyces lanuginosus* (GeneSeqP:BAA22485), *Talaromyces thermophilus* (GeneSeqP:BAA22834), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (documento WO 2009/079210), y *Trichophaea saccata* (documento WO 2011/057083).

Los ejemplos de xilanasas contempladas específicamente incluyen xilanasas GH10, tal como la derivada de una cepa del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como la descrita como Xyl III en el documento WO 2006/078256, o *Aspergillus aculeatus*, tal como la descrita en el documento WO 94/21785 como SEQ ID NO: 5 (Xyl II).

La xilanasas puede estar comprendida en una preparación de enzima celulolítica que además incluye una xilanasas. En una realización, la hemicelulasa es una preparación de enzima celulolítica que además comprende una xilanasas, preferiblemente una xilanasas GH10, tal como la derivada de una cepa del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como la descrita como Xyl III en el documento WO 2006/078256, o *Aspergillus aculeatus*, tal como la descrita en el documento WO 94/21785 como SEQ ID NO: 5 (Xyl II) o SEQ ID NO: 6 aquí.

En una realización, la xilanasas deriva de *Aspergillus aculeatus*, tal como la mostrada en SEQ ID NO: 6 aquí. En una realización preferida, la xilanasas deriva de *Aspergillus fumigatus*, tal como la mostrada en SEQ ID NO: 8 aquí.

Las xilanasas contempladas también incluyen aquellas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% de identidad, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad con la xilanasas de *Aspergillus fumigatus* en el documento WO 2006/078256 mostrado como SEQ ID NO: 8 aquí, o la xilanasas de *Aspergillus aculeatus* descrita en el documento WO 94/21785 como SEQ ID NO: 5 (Xyl II) o SEQ ID NO: 6 aquí.

En una realización, la xilanasas, por ejemplo derivada de una cepa de *Talaromyces leycettanus*, comprendida en la composición de enzima celulolítica, tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% de identidad, al menos 97%, al menos al menos 98%, al menos 99% de identidad con SEQ ID NO: 16 aquí.

Beta-xilosidasas

En una realización preferida, la hemicelulasa usada en un procedimiento de la invención es una beta-xilosidasas, o la composición de enzima hemicelulolítica comprende una beta-xilosidasas. El término "beta-xilosidasas" significa una beta-D-xilósido xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exohidrólisis de beta (1→4)-xilooligosacáridos cortos, para eliminar sucesivos restos de D-xilosa de los extremos no reductores. Para los fines de la presente invención, una unidad de beta-xilosidasas se define como 1,0 µmol de anión p-nitrofenolato producido por minuto a 40°C, pH 5, a partir de p-nitrofenil-beta-D-xilósido 1 mM como sustrato en 100 mM de citrato de sodio que contiene TWEEN® 20 al 0,01%.

Ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, beta-xilosidasas de *Neurospora crassa* (SwissProt:Q7SOW4), *Trichoderma reesei* (UniProtKB/TrEMBL:Q92458), *Talaromyces emersonii* (SwissProt:Q8X212), and *Talaromyces thermophilus* (GeneSeqP:BAA22816).

Los ejemplos de beta-xilosidasas contemplada específicamente incluyen la derivada de una cepa del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como la descrita en el documento WO 2013/028928 (Ejemplo 16 y 17) o SEQ ID NO: 9 aquí, o derivada de una cepa de *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*, tal como el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 58 en el documento WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 1 aquí.

La beta-xilosidasas usada en un procedimiento de la invención puede estar comprendida en una composición de enzima celulolítica. En una realización, la hemicelulasa es una composición de enzima celulolítica; tal como composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*; que comprende además una beta-xilosidasas, tal como la derivada de una cepa del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus fumigatus* (por ejemplo, la descrita en el documento WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 9 aquí), tal como la descrita en el documento WO 2013/028928 (Ejemplos 16 y 17),

o derivada de una cepa de *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*, tal como el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 58 en el documento WO 2011/057140.

Las beta-xilosidasas contempladas también incluyen aquellas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% de identidad, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad con la beta-xilosidasa de *Aspergillus fumigatus* descrita como SEQ ID NO: 206 en el documento WO 2011/057140 o SEQ ID NO: 9 aquí, o cualquiera de las beta-xilosidasas mencionadas aquí.

En una realización, la beta-xilosidasa, por ejemplo derivada de una cepa de *Talaromyces emersonii*, comprendida en la composición de enzima celulolítica, tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% de identidad, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad con SEQ ID NO: 17 aquí.

La hemicelulasa utilizada en un procedimiento de la invención puede comprender un producto de hemicelulasa comercial. Ejemplos de productos comerciales de hemicelulasa incluyen, por ejemplo, SHEARZYME™ (Novozymes A/S), CELLIC™ HTec (Novozymes A/S), CELLIC™ HTec2 (Novozymes A/S), CELLIC™ HTec3 (Novozymes), VISCOZYME® (Novozymes A/S), ULTRAFLO® (Novozymes A/S), PULPZYME® HC (Novozymes A/S), MULTIFECT® Xylanase (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 Xylanase (DSM), DEPOL™ 333P (Biocatalysts Limit, Wales, UK), DEPOL™ 740L (Biocatalysts Limit, Wales, UK), y DEPOL™ 762P (Biocatalysts Limit, Wales, UK).

Catalasas

Las composiciones de enzima celulolítica pueden comprender una catalasa. La catalasa puede ser cualquier catalasa. La catalasa puede incluir, pero no se limita a, una catalasa E.C. 1.11.1.6 o E.C. 1.11.1.21.

Los ejemplos de catalasas útiles incluyen, pero no se limitan a, catalasas de *Alcaligenes aquamarinus* (documento WO 98/00526), *Aspergillus lentilus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* (Patente U.S. No. 5,360,901), *Aspergillus oryzae* (documento JP 2002223772A; Patente U.S. No. 6,022,721), *Bacillus thermoglucosidasius* (documento JP 1 1243961A), *Humicola insolens* (documentos WO 2009/104622, WO 2012/130120), *Malbranchea cinnamomea*, *Microscilla furvescens* (documento WO 98/00526), *Neurospora crassa*, *Penicillium emersonii* (documento WO 2012/130120), *Penicillium pinophilum*, *Rhizomucor pusillus*, *Saccharomyces pastorianus* (documento WO 2007/105350), *Scytalidium thermophilum*, *Talaromyces stipitatus* (documento WO 2012/130120), *Thermoascus aurantiacus* (documento WO 2012/130120), *Thermus brockianus* (documento WO 2005/044994), y *Thielavia terrestris* (documento WO 2010/074972).

Las catalasas útiles son las catalasas de *Bacillus pseudofirmus* (UNIPROT:P30266), *Bacillus subtilis* (UNIPROT:P42234), *Humicola grisea* (GeneSeqP: AXQ55105), *Neosartorya fischeri* (UNIPROT:A1DJU9), *Penicillium emersonii* (GeneSeqP:BAC10987), *Penicillium pinophilum* (GeneSeqP:BAC10995), *Scytalidium thermophilum* (GeneSeqP:AAW06109 o ADT89624), *Talaromyces stipitatus* (GeneSeqP:BAC10983 o BAC11039; UNIPROT:B8MT74), y *Thermoascus aurantiacus* (GeneSeqP:BAC11005). Los números de acceso se incorporan aquí en su totalidad.

En una realización preferida, las composiciones de enzima celulolítica pueden comprender una catalasa, por ejemplo la derivada de *Thermoascus*, en particular *Thermoascus aurantiacus*, en particular la mostrada en el documento WO 2012/130120 o SEQ ID NO: 19 aquí.

En una realización, la catalasa, por ejemplo la derivada de una cepa de *Thermoascus auranticus*, se selecciona del grupo que consiste en:

(i) una catalasa que comprende el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 19 aquí;

(ii) una catalasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60%, al menos 70%, por ejemplo al menos 75%, al menos el 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 19 aquí.

El contenido de proteína de la catalasa está en el intervalo de alrededor de 0,5% a alrededor de 10%, por ejemplo alrededor de 0,5% a alrededor de 7%, alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, alrededor de 0,5% a alrededor de 4%, alrededor de 0,5% a alrededor de 3%, alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, y alrededor de 0,5% a alrededor de 1% de proteína enzimática total en la reacción de sacarificación/hidrólisis.

En una realización, la relación de proteína de catalasa a composición de enzima celulolítica está en el intervalo de alrededor de 1:200 a alrededor de 1:10, por ejemplo alrededor de 1:100 a alrededor de 1:15, o alrededor de 1:50 a alrededor de 1:25.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

MATERIAL Y MÉTODOS

5 Materiales:

Composición de Enzima Celulolítica CA ("CA"): Preparación de enzima celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* que además comprende polipéptido GH61A que tiene actividad potenciadora celulolítica derivado de una cepa de *Penicillium emersonii* (SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2011/041397 o SEQ ID NO: 7 aquí), beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2005/047499 o SEQ ID NO: 5 aquí) variante F100D, S283G, N456E, F512Y) descrita en el documento WO 2012/044915; CBH1 Cel7A de *Aspergillus fumigatus* descrita como SEQ ID NO: 6 en el documento WO2011/057140 y SEQ ID NO: 10 aquí, y CBH II de *Aspergillus fumigatus* descrita como SEQ ID NO: 18 en el documento WO 2011/057140 y SEQ ID NO: 11 aquí. Además, la Preparación de Enzima Celulolítica CA comprende además 10% de una preparación de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además xilanasa de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 8 aquí) y beta-xilosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 9 aquí).

Composición de Enzima Celulolítica CB ("CB"): Preparación de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende EG I de SEQ ID NO: 21 aquí, EG II de SEQ ID NO: 22 aquí, CBH I de SEQ ID NO: 14 aquí; CBH II de SEQ ID NO: 15 aquí; variante de beta-glucosidasa de SEQ ID NO: 5 aquí, con las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y; el AA9 (polipéptido GH61) de SEQ ID NO: 7 aquí, xilanasa GH10 de SEQ ID NO: 16 aquí; y beta-xilosidasa de SEQ ID NO: 17 aquí.

CIBTS1260: Levadura de *Saccharomyces cerevisiae* depositada por Novozymes A/S bajo los términos del Tratado de Budapest con la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 EE.UU.) y a la que se le otorgó el siguiente número de acceso:

Depósito	Número de acceso	Fecha de deposito
CIBTS1260	NRRL Y-50973	5 de septiembre de 2014

BSGX001 se describe en la patente US No. 8.586.336-B2, y se construyó de la siguiente manera: La cepa hospedante BSPX042 de *Saccharomyces cerevisiae* (fenotipo: ura3-251, sobreexpresión de XKS1; sobreexpresión de RPE1, RKI1, TAL1, y TKL1, los cuales son genes en PPP; sin el gen de aldosa reductasa GRE3; y daño de la cadena respiratoria de transporte de electrones al suprimir el gen COX4 después de la evolución adaptativa) se transformó con el vector pJFE3-RuXI insertado con el gen de xilosa isomerasa (SEQ ID NO: 1 en la patente US No. 8.586.336-B2 o SEQ ID NO: 20 aquí) que codifica RuXI mostrada en SEQ ID NO: 2 en la patente US No. 8.586.336-B2 o SEQ ID NO: 13 aquí.

Métodos:

40 Identidad

La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias polinucleotídicas se describe mediante el parámetro "identidad".

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiples: penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineación por pares son Ktuple=1, penalización de espacio=3, ventanas=5, y diagonales=5.

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias polinucleotídicas se determina mediante el método de Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) utilizando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiples: penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineación por pares son Ktuple=3, penalización de espacio=3, y ventanas = 20.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Construcción de la cepa CIBTS1000.

Se identificó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* diploide que se sabe que es un productor eficiente de etanol a partir de glucosa. Se utilizó la cepa CCTCC M94055 de *S. cerevisiae* Chinese Center for Type Culture Collection (CCTCC).

5 Se clonó una xilosa isomerasa, denominada mgXI, a partir de un proyecto de metagenómico, lo que significa que se desconoce el organismo donante. El aislamiento y las características de esta xilosa isomerasa se describen en la solicitud de patente CN No. 102174549A o la publicación de patente US No. 2012/0225452.

10 Se clonó un transportador de pentosa, denominado GXF, de *Candida intermedia* utilizando métodos estándar. Este transportador de xilosa se describió por D. Runquist et. al. (Runquist D, Fonseca C, Radstrom P, Spencer-Martins I, Hahn-Hagerdal B: "Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*". Appl Microbiol Biotechnol 2009, 82:123-130).

15 El gen de la xilosa isomerasa se fusionó con el promotor de Triosa Fosfato Isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae* y el terminador de TPI usando métodos estándar, de manera que la expresión de la xilosa isomerasa en *S. cerevisiae* se controlara por las señales de expresión de TPI.

El gen GXF se fusionó con las señales de expresión de TPI de la misma manera.

20 Estos dos casetes de expresión se insertaron en un vector de clonación de *Escherichia coli* que contiene:

- El origen de replicación de *E. coli* colE1 que asegura que el plásmido se pudiera propagar en *E. coli*.
- Un fragmento de la secuencia delta (δ) de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Un marcador de resistencia a la zeocina de *Streptoalloteichus hindustanus* para la selección de transformantes de *E. coli* o *S. cerevisiae* resistentes a zeocina. Se fusionó un doble promotor al extremo 5' del gen de zeocina que consiste en un promotor del Factor de Alargamiento de la Traducción (TEF1) de *S. cerevisiae* y un promotor EM7 de *E. coli*. El terminador CYC1 de *S. cerevisiae* se añadió al extremo 3' del gen de zeocina. Todo el casete de expresión de zeocina estaba flanqueado por sitios loxP para permitir la eliminación de este casete de expresión mediante recombinación Cre-lox (B. Sauer: "Functional expression of the Cre-Lox site specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol. Cell. Biol. 1987, 7: 2087-2096).

35 El plásmido de expresión de xilosa isomerasa/transportador de pentosa se denominó pYIE2-mgXI-GXF1- δ , y se muestra en la Fig. 1.

40 El plásmido pYIE2-mgXI-GXF1-delta se linealizó primero mediante digestión con XhoI, y después se transformó en la cepa parental *Saccharomyces cerevisiae* CCTCC M94055 tras la selección de transformantes resistentes a zeocina. Se aisló una cepa denominada CIBTS0912 que tiene el plásmido integrado en una secuencia delta. El casete de resistencia a zeocina ubicado entre los dos sitios loxP se eliminó entonces mediante expresión transitoria de recombinasa CRE, dando como resultado la cepa CIBTS0914.

45 La expresión transitoria de recombinasa CRE se logró de forma similar al método estándar de levadura descrito por Prein et. al. (Prein B, Natter K, Kohlwein SD. "A novel strategy for constructing N-terminal chromosomal fusions to green fluorescent protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". FEBS Lett. 2000: 485, 29-34.), transformando con un plásmido inestable que expresa la recombinasa CRE, seguido del curado para ese plásmido nuevamente. En este trabajo, el gen de kanamicina del vector estándar de levadura pSH47 se reemplazó por un marcador de resistencia a higromicina de modo que en lugar de seleccionar la resistencia a kanamicina, se utilizó la selección para higromicina. En la Fig. 2 se muestra un mapa plasmídico del plásmido pSH47-hyg usado.

Nombre del gen /elemento	Función	origen
Cre	Recombinasa que cataliza la recombinación entre los sitios lox	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
GAL1p	Promotor de levadura inducido por galactosa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
ScCYC1t	Terminador de levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
hph	Gen de resistencia a higromicina.	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> .

Nombre del gen /elemento	Función	origen
URA3	Marcador de selección auxotrófica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
CEN6/ARSH4	Origen de replicación	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
pUC Ori	Origen de replicación de E. coli	<i>Escherichia coli</i>
AmpR	Gen de resistencia a ampicilina	<i>Escherichia coli</i>

La cepa CIBTS0914 se transformó de nuevo con pYIE2-mgXI-GXF1- δ digerido con XhoI para aumentar el número de copias de los dos casetes de expresión, y se seleccionó una cepa resistente a zeocina, CIBTS0916.

Para sobreexpresar los genes de la ruta de pentosa fosfato, se ensambló un plásmido de expresión que albergaba los genes seleccionados de la ruta de pentosa fosfato.

Los genes seleccionados para la sobreexpresión fueron:

1. Xiluloquinasa (XKS1).
2. Trans-aldolasa (TAL1).
3. Ribulosa 5 fosfato epimerasa (RPE1).
4. Transcetolasa (TKL1).
5. Ribosa 5 fosfato isomerasa (RKI1)

Además de estos genes, el casete de selección KanMX, rodeado por sitios loxP, se incluyó como parte del vector lanzadera pUG6 de *E. coli* - *S. cerevisiae* (Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast." NAR 1996, 24:2519-24).

En la Fig. 3 se muestra un mapa del plásmido pYIE2-XKS1-PPP- δ resultante. A continuación, se muestra una tabla que enumera los elementos genéticos utilizados:

Posición de la base (pb)	Tamaño (pb)	Elemento genético	Descripción	Origen
1- 1500	1500	ADH1p	Promotor ADH1 de levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1501-3303	1803	XKS1	Xiluloquinasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3303-3563	260	XKS1t	Terminador de xiluloquinasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3564-4149	586	TPI 1p	Promotor TPI de levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4150-5257	1108	TAL1	Trans-aldolasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5258-5657	400	TAL1t	Terminador de trans-aldolasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5658-6407	750	PGK1p	Promotor PGK de levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
6408-7124	717	RPE1	Ribulosa 5 fosfato epimerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
7125-7524	400	RPE1t	Terminador de ribulosa 5 fosfato epimerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Posición de la base (pb)	Tamaño (pb)	Elemento genético	Descripción	Origen
7525-8344	820	FBA1p	Promotor FBA de levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
8345-10387	2043	TKL1	Transcetolasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10387-10667	280	TKL1t	Terminador de trans-cetolasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10668-11467	800	PDC1p	Promotor PDC de levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
11468-12444	777	RKI1	Ribosa 5 fosfato isomerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
12445-12644	400	RKI1t	Terminador de ribosa 5 fosfato isomerasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
12645-12844	200	Delta up	Secuencia en dirección 5' del ADN delta	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
12845-14565	1720	pUG6	Vector de E. coli que incluye el origen ColE1 para la replicación en E. coli y el origen de replicación CEN6/ARS para la replicación en levadura	<i>Escherichia coli</i>
14566-14865	300	Delta Dn	Secuencia en dirección 3' del ADN delta	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
14866-14907	82	Enlazador	Enlazador sintético	ADN sintético
14908-14941	34	loxP	Sitio de recombinación Lox	Bacteriófago P1
14942-15339	398	TEF1p	Promotor TEF de <i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
15340-16149	810	KanMX	Marcador de resistencia a kanamicina (G418)	<i>Escherichia coli</i>
16150-16414	256	TEF1t	Terminador TEF de <i>A. gossypii</i> .	<i>Ashbya gossypii</i>
16415-16448	34	loxP	Sitio de recombinación Lox	Bacteriófago P1
16449-16475	27	Enlazador	Enlazador sintético	ADN sintético

El plásmido pYIE2-XKS1-PPP- δ se digirió con NotI, y los elementos del vector se eliminaron mediante electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el fragmento lineal que contenía todos los casetes de expresión se transformó en CIBTS0916 para la recombinación homóloga doble seguida de la selección para la resistencia a kanamicina (G418). Se seleccionó una colonia resistente a la kanamicina, y se denominó CIBTS0931.

CIBTS0931 contiene tanto el marcador de selección de zeocina como el marcador de selección de kanamicina. Ambos están flanqueados por sitios de recombinación loxP.

Para eliminar los marcadores de resistencia a zeocina y kanamicina, la cepa se transformó de nuevo con el plásmido episomal pSH47-hyg, y los transformantes se seleccionaron en placas que contenían higromicina. Posteriormente, se realizó el cribado de transformantes que habían perdido resistencia a zeocina y kanamicina, y después de eso, se realizó el cribado de una cepa que también perdió el marcador de resistencia a higromicina. Se seleccionó una cepa CIBTS1000, y se demostró que había perdido el plásmido pSH47-hyg.

Ejemplo 2

Adaptación de la cepa CIBTS1000 a una alta absorción de xilosa y resistencia al acetato.

La cepa CIBTS1000 se modificó para que pudiera utilizar xilosa como fuente de carbono y fermentarla a etanol. Sin embargo, la utilización de xilosa fue muy ineficaz. Una forma bien conocida de mejorar eso, en el campo de la ingeniería metabólica, es utilizar la adaptación. Esto también se hizo en este caso. La cepa CIBTS1000 se transfirió en serie de matraz de agitación a matraz de agitación en un medio que contenía xilosa como única fuente de carbono e inhibidores del crecimiento de levaduras que se sabe que están presentes en los hidrolizados de biomasa celulósica. Durante estas transferencias en serie, se acumulan mutaciones que permiten que la cepa crezca mejor en las condiciones proporcionadas - y de ese modo utilice mejor la xilosa.

En una primera ronda de adaptación, CIBTS1000 se transfirió en serie en un sistema de matraz de agitación utilizando medio YPX (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, y 20 g/l de xilosa) e YPDX (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 10 g/l de glucosa, y 10 g/l de xilosa).

En una segunda ronda de adaptación, la transferencia en serie se realizó en YPXI (YPX suplementado con formiato de sodio 43 mM, acetato de sodio 50 mM, y sulfato de sodio 100 mM) e YPDXI (YPDX suplementado con formiato de sodio 43 mM, acetato de sodio 50 mM, y sulfato de sodio 100 mM).

En una ronda final de adaptación, la transferencia en serie se realizó usando hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido NREL (véase el Ejemplo 3) suplementado con 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 10 g/l de glucosa, y 10 g/l de xilosa.

Se seleccionó una cepa denominada CIBTS1260-J132-F3 como cepa adaptada.

Ejemplo 3

Comparación de fermentación de CIBTS1260 y BSGX001 en hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido NREL

Las dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, CIBTS1260 y BSGX001, se ensayaron en hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido NREL (ácido sulfúrico al 4% p/p a 180°C durante 5 minutos). El hidrolizado se produjo después de 3 días de hidrólisis en un reactor de 20 kg a 50°C con 20 mg de proteína enzimática/g de glucano de la Composición de Enzima Celulolítica CA. El hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido tenía una composición final de 63,2 g/l de glucosa, 44,9 g/l de xilosa, 0,8 g/l de glicerol, y 9,5 g/l de acetato. Antes de la fermentación, cada cepa se propagó en un agitador de aire a 30°C a 150 rpm en medio YPD (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, y 20 g/l de glucosa). Después de 24 horas de crecimiento, estas dos cepas de levadura se evaluaron en 50 ml de hidrolizado en matraces Erlenmeyer con deflectores de 125 ml a una incorporación de levadura de 1 g de peso celular seco (DCW)/l. Para sellar cada matraz, se usaron tapones de goma equipados con agujas de relleno romas de calibre 18, y los matraces se colocaron en un agitador de aire a 35°C a una velocidad de 150 rpm. Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas, para la determinación de las concentraciones de glucosa, xilosa y etanol mediante análisis por HPLC. Los resultados se promediaron para cada conjunto de 3 réplicas, y se dan en la Figura 1, que muestra una comparación de CIBTS1260 frente a BSGX001 en hidrolizado de rastrojo de maíz pretratado con ácido NREL a 1 g/l de incorporación de levadura en 72 horas. Como se muestra en la Fig. 4, a las 48 horas, la cepa CIBTS1260 completó el consumo total de xilosa y produjo aproximadamente 47 g/l de etanol. Sin embargo, la cepa BSGX001 fue lenta para absorber glucosa para la conversión a etanol, y de este modo consumió solo 3 g/l de xilosa. Estos resultados indican que CIBTS1260 da como resultado una mejor absorción y utilización de xilosa para la conversión en etanol en comparación con BSGX001.

Ejemplo 4

Comparación de CIBTS1260 y BSGX001 para el rendimiento de fermentación en medios modelo

Se comparó el rendimiento de fermentación de CIBTS1260 y su precursor BSGX001. Antes de la fermentación, cada cepa se propagó en un agitador de aire a 30°C a 150 rpm en medio YPD (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, y 20 g/l de glucosa). Después de 24 horas de crecimiento, estas dos cepas de levadura se evaluaron en medio YPX (5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, y 50 g/l de xilosa). Para evaluar el rendimiento de la fermentación, cada cepa se inoculó en 50 ml de medio YPX en matraces Erlenmeyer con deflectores de 125 ml, a una incorporación de levadura de 2 g de DCW/l. Para sellar cada matraz, se usaron tapones de goma equipados con agujas de relleno romas de calibre 18, y los matraces se colocaron en un agitador de aire a 32°C a una velocidad de 150 rpm. Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas, para la determinación de las concentraciones de glucosa, xilosa y etanol mediante análisis por HPLC. Los resultados se promediaron para cada conjunto de 3 repeticiones y se muestran en la Figura 5.

Como se muestra en la Fig. 5, CIBTS1260 (líneas de puntos) ha utilizado completamente toda la xilosa disponible en 24 horas, y produjo 21,3 g/l de etanol. En el tiempo de fermentación de 72 horas, BSGX001 (líneas continuas) consumió 1,5 g/l de xilosa, y la concentración de etanol resultante fue 1,3 g/l.

Ejemplo 5**Fermentación de hidrolizado de bagazo de Composición de enzima Celulolítica CA ("CA") y Composición de enzima Celulolítica CB ("CB") con CIBTS1260**

CIBTS1260 se utilizó en ensayos de fermentación con hidrolizados de bagazo pretratados con ácido diluido NREL generados en Novozymes North America, EE.UU. El hidrolizado se produjo después de 5 días de hidrólisis en reactores IKA de 2 l a 50°C con una dosis de 6 mg de proteína enzimática/g de glucano de dos composiciones de enzima celulolítica denominadas "CA" y "CB". Estos materiales son puntos de referencia representativos para hidrolizados de bagazo pretratados con ácido diluido con composiciones finales de 40,7 y 58,7 g/l de glucosa, 42,5 y 44,7 g/l de xilosa, 0,19 y 0,08 g/l de glicerol, y 8,99 y 11,3 g/l de acetato para "CA" y "CB", respectivamente. Antes de la fermentación, la levadura se propagó en un agitador de aire a 30°C a 150 rpm en medio YPD al 2% (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, y 20 g/l de glucosa). Después de 24 horas de crecimiento, CIBTS1260 se evaluó en 50 ml de hidrolizado "CA" y "CB" en matraces Erlenmeyer con deflectores de 125 ml a una incorporación de levadura de 1 g de DCW/l. Para sellar cada matraz, se usaron tapones de goma equipados con agujas de relleno romas de calibre 18, y los matraces se colocaron en un agitador de aire a 35°C a una velocidad de 150 rpm. Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 horas para la determinación de las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol, acetato y glicerol mediante análisis de HPLC. Los resultados se promediaron para cada conjunto de 3 repeticiones y se muestran en la Figura 6. Más del 95% de la glucosa y xilosa presente en ambos sistemas se consumió dentro del período de 72 horas, con rendimientos de etanol sobre azúcares totales de 84,1% para el hidrolizado "CA" y 86,4% para el hidrolizado "CB".

Ejemplo 6**Reducción de DP2 durante fermentaciones con CIBTS1260 y BSGX001 hidrolizados de bagazo de rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido y de caña de azúcar**

El bagazo de rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido y de caña de azúcar del National Renewable Energy Laboratory (NREL), EE.UU., se hidrolizaron con una dosis de 6 mg de proteína enzimática/g de glucano de dos cócteles de productos enzimáticos denominados CA y CB durante 5 días en reactores IKA de 2 l a 50°C. Antes de la fermentación, las levaduras CIBTS1260 y BSGX001 se propagaron en un agitador de aire a 30°C a 150 rpm en medio YPD (10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona y 20 g/l de glucosa). Después de 24 horas de crecimiento, las células de cada cepa se recolectaron mediante centrifugación, y se añadieron a 50 ml de hidrolizado de CA y CB suplementado con 2 g/l de urea en matraces Erlenmeyer con deflectores de 125 ml a una incorporación de levadura de 1 g de DCW/l (peso celular seco/l), respectivamente. Para sellar cada matraz, se usaron tapones de goma equipados con agujas de relleno romas de calibre 18, y los matraces se colocaron en un agitador de aire a 35°C a una velocidad de 150 rpm. Se tomaron muestras a las 0 y 72 horas para determinar las concentraciones de DP2 mediante análisis de HPLC. Los resultados se promediaron para cada conjunto de réplicas (n = 3 para CIBTS1260, y n = 2 para BSGX001). Como se muestra en la Figura 7, en los mismos hidrolizados, las concentraciones de DP2 se redujeron más para las fermentaciones realizadas con CIBTS1260 que para las fermentaciones con BSGX001. El pico de DP2, medido en HPLC, contiene celobiosa y azúcares de cadena corta.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S SUTTON, Kate Brandon DIAO, Liuyang JIANG, Yu YANG, Sheng
 <120> PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR ETANOL Y ORGANISMOS
 FERMENTADORES
 <130> 13021-WO-PCT[4]
 <160> 22
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 797
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei
 <400> 1

ES 2 896 153 T3

Met	Val	Asn	Asn	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Pro	1	5	10	15
Thr	Ala	Leu	Ala	Gln	Asn	Asn	Gln	Thr	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ser	Ala	Gln	20	25	30	
Gly	Gln	Pro	Asp	Leu	Tyr	Pro	Glu	Thr	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	35	40	45	
Phe	Pro	Asp	Cys	Glu	His	Gly	Pro	Leu	Lys	Asn	Asn	Leu	Val	Cys	Asp	50	55	60	
Ser	Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Glu	Arg	Ala	Gln	Ala	Leu	Ile	Ser	Leu	Phe	65	70	75	80
Thr	Leu	Glu	Glu	Leu	Ile	Leu	Asn	Thr	Gln	Asn	Ser	Gly	Pro	Gly	Val	85	90	95	
Pro	Arg	Leu	Gly	Leu	Pro	Asn	Tyr	Gln	Val	Trp	Asn	Glu	Ala	Leu	His	100	105	110	
Gly	Leu	Asp	Arg	Ala	Asn	Phe	Ala	Thr	Lys	Gly	Gly	Gln	Phe	Glu	Trp	115	120	125	
Ala	Thr	Ser	Phe	Pro	Met	Pro	Ile	Leu	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu	Asn	Arg	130	135	140	
Thr	Leu	Ile	His	Gln	Ile	Ala	Asp	Ile	Ile	Ser	Thr	Gln	Ala	Arg	Ala	145	150	155	160

ES 2 896 153 T3

Phe Ser Asn Ser Gly Arg Tyr Gly Leu Asp Val Tyr Ala Pro Asn Val
 165 170 175
 Asn Gly Phe Arg Ser Pro Leu Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly
 180 185 190
 Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ser Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Tyr Ile Thr
 195 200 205
 Gly Ile Gln Gly Gly Val Asp Pro Glu His Leu Lys Val Ala Ala Thr
 210 215 220
 Val Lys His Phe Ala Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Asn Asn Gln Ser
 225 230 235 240
 Arg Leu Gly Phe Asp Ala Ile Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ser Glu Tyr
 245 250 255
 Tyr Thr Pro Gln Phe Leu Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Lys Ser Arg Ser
 260 265 270
 Leu Met Cys Ala Tyr Asn Ser Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn
 275 280 285
 Ser Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Ser Trp Gly Phe Pro Glu
 290 295 300
 Trp Gly Tyr Val Ser Ser Asp Cys Asp Ala Val Tyr Asn Val Phe Asn
 305 310 315 320
 Pro His Asp Tyr Ala Ser Asn Gln Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Leu
 325 330 335
 Arg Ala Gly Thr Asp Ile Asp Cys Gly Gln Thr Tyr Pro Trp His Leu
 340 345 350
 Asn Glu Ser Phe Val Ala Gly Glu Val Ser Arg Gly Glu Ile Glu Arg
 355 360 365
 Ser Val Thr Arg Leu Tyr Ala Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp
 370 375 380
 Lys Lys Asn Gln Tyr Arg Ser Leu Gly Trp Lys Asp Val Val Lys Thr
 385 390 395 400
 Asp Ala Trp Asn Ile Ser Tyr Glu Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Leu
 405 410 415

ES 2 896 153 T3

Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Pro Leu Ser Lys Lys Val Arg Ser Ile
 420 425 430
 Ala Leu Ile Gly Pro Trp Ala Asn Ala Thr Thr Gln Met Gln Gly Asn
 435 440 445
 Tyr Tyr Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Glu Ala Ala Lys
 450 455 460
 Lys Ala Gly Tyr His Val Asn Phe Glu Leu Gly Thr Glu Ile Ala Gly
 465 470 475 480
 Asn Ser Thr Thr Gly Phe Ala Lys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ser
 485 490 495
 Asp Ala Ile Ile Tyr Leu Gly Gly Ile Asp Asn Thr Ile Glu Gln Glu
 500 505 510
 Gly Ala Asp Arg Thr Asp Ile Ala Trp Pro Gly Asn Gln Leu Asp Leu
 515 520 525
 Ile Lys Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys Pro Leu Val Val Leu Gln Met
 530 535 540
 Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Lys Val
 545 550 555 560
 Asn Ser Leu Val Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Val Ala
 565 570 575
 Leu Phe Asp Ile Leu Ser Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val
 580 585 590
 Thr Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Val His Gln Phe Pro Gln Asn Asp
 595 600 605
 Met Asn Leu Arg Pro Asp Gly Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Ile
 610 615 620
 Trp Tyr Thr Gly Lys Pro Val Tyr Glu Phe Gly Ser Gly Leu Phe Tyr
 625 630 635 640
 Thr Thr Phe Lys Glu Thr Leu Ala Ser His Pro Lys Ser Leu Lys Phe
 645 650 655
 Asn Thr Ser Ser Ile Leu Ser Ala Pro His Pro Gly Tyr Thr Tyr Ser
 660 665 670

ES 2 896 153 T3

Glu Gln Ile Pro Val Phe Thr Phe Glu Ala Asn Ile Lys Asn Ser Gly
675 680 685

Lys Thr Glu Ser Pro Tyr Thr Ala Met Leu Phe Val Arg Thr Ser Asn
690 695 700

Ala Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg
705 710 715 720

Leu Ala Asp Ile Lys Pro Gly His Ser Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ile
725 730 735

Pro Val Ser Ala Leu Ala Arg Val Asp Ser His Gly Asn Arg Ile Val
740 745 750

Tyr Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Thr Asp Glu Ser Val Lys
755 760 765

Leu Glu Phe Glu Leu Val Gly Glu Glu Val Thr Ile Glu Asn Trp Pro
770 775 780

Leu Glu Glu Gln Gln Ile Lys Asp Ala Thr Pro Asp Ala
785 790 795

<210> 2

<211> 452

<212> PRT

<213> Thielavia terrestris

<400> 2

Met Leu Ala Asn Gly Ala Ile Val Phe Leu Ala Ala Ala Leu Gly Val
1 5 10 15

Ser Gly His Tyr Thr Trp Pro Arg Val Asn Asp Gly Ala Asp Trp Gln
20 25 30

Gln Val Arg Lys Ala Asp Asn Trp Gln Asp Asn Gly Tyr Val Gly Asp
35 40 45

Val Thr Ser Pro Gln Ile Arg Cys Phe Gln Ala Thr Pro Ser Pro Ala
50 55 60

Pro Ser Val Leu Asn Thr Thr Ala Gly Ser Thr Val Thr Tyr Trp Ala
65 70 75 80

Asn Pro Asp Val Tyr His Pro Gly Pro Val Gln Phe Tyr Met Ala Arg
85 90 95

ES 2 896 153 T3

Val	Pro	Asp	Gly	Glu	Asp	Ile	Asn	Ser	Trp	Asn	Gly	Asp	Gly	Ala	Val	100	105	110	
Trp	Phe	Lys	Val	Tyr	Glu	Asp	His	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gln	Leu	Thr	115	120	125	
Trp	Pro	Ser	Thr	Gly	Lys	Ser	Ser	Phe	Ala	Val	Pro	Ile	Pro	Pro	Cys	130	135	140	
Ile	Lys	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu	Gln	Ile	Gly	Leu	His	145	150	155	160
Val	Ala	Gln	Ser	Val	Gly	Gly	Ala	Gln	Phe	Tyr	Ile	Ser	Cys	Ala	Gln	165	170	175	
Leu	Ser	Val	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Glu	Pro	Pro	Asn	Lys	Val	Ala	180	185	190	
Phe	Pro	Gly	Ala	Tyr	Ser	Ala	Thr	Asp	Pro	Gly	Ile	Leu	Ile	Asn	Ile	195	200	205	
Tyr	Tyr	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Tyr	Gln	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Val	Phe	210	215	220	
Ser	Cys	Met	Leu	Ala	Asn	Gly	Ala	Ile	Val	Phe	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	225	230	235	240
Gly	Val	Ser	Gly	His	Tyr	Thr	Trp	Pro	Arg	Val	Asn	Asp	Gly	Ala	Asp	245	250	255	
Trp	Gln	Gln	Val	Arg	Lys	Ala	Asp	Asn	Trp	Gln	Asp	Asn	Gly	Tyr	Val	260	265	270	
Gly	Asp	Val	Thr	Ser	Pro	Gln	Ile	Arg	Cys	Phe	Gln	Ala	Thr	Pro	Ser	275	280	285	
Pro	Ala	Pro	Ser	Val	Leu	Asn	Thr	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Thr	Tyr	290	295	300	
Trp	Ala	Asn	Pro	Asp	Val	Tyr	His	Pro	Gly	Pro	Val	Gln	Phe	Tyr	Met	305	310	315	320
Ala	Arg	Val	Pro	Asp	Gly	Glu	Asp	Ile	Asn	Ser	Trp	Asn	Gly	Asp	Gly	325	330	335	
Ala	Val	Trp	Phe	Lys	Val	Tyr	Glu	Asp	His	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gln				

ES 2 896 153 T3

340

345

350

Leu Thr Trp Pro Ser Thr Gly Lys Ser Ser Phe Ala Val Pro Ile Pro
355 360 365

Pro Cys Ile Lys Ser Gly Tyr Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Gln Ile Gly
370 375 380

Leu His Val Ala Gln Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Cys
385 390 395 400

Ala Gln Leu Ser Val Thr Gly Gly Gly Ser Thr Glu Pro Pro Asn Lys
405 410 415

Val Ala Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile
420 425 430

Asn Ile Tyr Tyr Pro Val Pro Thr Ser Tyr Gln Asn Pro Gly Pro Ala
435 440 445

Val Phe Ser Cys
450

<210> 3

<211> 326

<212> PRT

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 3

Met Lys Ser Phe Thr Ile Ala Ala Leu Ala Ala Leu Trp Ala Gln Glu
1 5 10 15

Ala Ala Ala His Ala Thr Phe Gln Asp Leu Trp Ile Asp Gly Val Asp
20 25 30

Tyr Gly Ser Gln Cys Val Arg Leu Pro Ala Ser Asn Ser Pro Val Thr
35 40 45

Asn Val Ala Ser Asp Asp Ile Arg Cys Asn Val Gly Thr Ser Arg Pro
50 55 60

Thr Val Lys Cys Pro Val Lys Ala Gly Ser Thr Val Thr Ile Glu Met
65 70 75 80

His Gln Gln Pro Gly Asp Arg Ser Cys Ala Asn Glu Ala Ile Gly Gly
85 90 95

Asp His Tyr Gly Pro Val Met Val Tyr Met Ser Lys Val Asp Asp Ala

5

ES 2 896 153 T3

[illegible]

<210> 4

<211> 250

<212> PRT

<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 4

ES 2 896 153 T3

```

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

Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp Gly
          20          25          30

Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser
          35          40          45

Asn Pro Pro Glu Val Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly
          50          55          60

Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Arg
65          70          75          80

Gly Ala Lys Pro Gly Ala Leu Thr Ala Pro Val Ser Pro Gly Gly Thr
          85          90          95

Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val
          100          105          110

Ile Asn Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ser Thr Val Asp Lys
          115          120          125

Thr Gln Leu Glu Phe Phe Lys Ile Ala Glu Ser Gly Leu Ile Asn Asp
130          135          140

Asp Asn Pro Pro Gly Ile Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ala Asn
145          150          155          160

Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Thr Thr Ile Ala Pro Gly Asn Tyr
          165          170          175

Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gln Asn Gln Asp
          180          185          190

Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Gln Val Thr Gly Gly
          195          200          205

Gly Ser Asp Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr His Asp
210          215          220

Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gln Lys Leu Ser Ser Tyr
225          230          235          240

Ile Ile Pro Gly Pro Pro Leu Tyr Thr Gly
          245          250

```

<210> 5

<211> 863

<212> PRT

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 5

ES 2 896 153 T3

Met	Arg	Phe	Gly	Trp	Leu	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Ala	Ser	Val	1	5	10	15
Ala	Asn	Ala	Gln	Glu	Leu	Ala	Phe	Ser	Pro	Pro	Phe	Tyr	Pro	Ser	Pro	20	25	30	
Trp	Ala	Asp	Gly	Gln	Gly	Glu	Trp	Ala	Asp	Ala	His	Arg	Arg	Ala	Val	35	40	45	
Glu	Ile	Val	Ser	Gln	Met	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Asn	Leu	Thr	Thr	50	55	60	
Gly	Thr	Gly	Trp	Glu	Met	Asp	Arg	Cys	Val	Gly	Gln	Thr	Gly	Ser	Val	65	70	75	80
Pro	Arg	Leu	Gly	Ile	Asn	Trp	Gly	Leu	Cys	Gly	Gln	Asp	Ser	Pro	Leu	85	90	95	
Gly	Ile	Arg	Phe	Ser	Asp	Leu	Asn	Ser	Ala	Phe	Pro	Ala	Gly	Thr	Asn	100	105	110	
Val	Ala	Ala	Thr	Trp	Asp	Lys	Thr	Leu	Ala	Tyr	Leu	Arg	Gly	Lys	Ala	115	120	125	
Met	Gly	Glu	Glu	Phe	Asn	Asp	Lys	Gly	Val	Asp	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	130	135	140	
Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Gly	Lys	Tyr	Pro	Asp	Gly	Gly	Arg	Ile	Trp	Glu	145	150	155	160
Gly	Phe	Ser	Pro	Asp	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Leu	Phe	Ala	Glu	Thr	165	170	175	
Ile	Lys	Gly	Ile	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	His	Tyr	180	185	190	
Ile	Leu	Asn	Glu	Gln	Glu	His	Phe	Arg	Gln	Val	Gly	Glu	Ala	Gln	Gly	195	200	205	

ES 2 896 153 T3

Tyr	Gly	Tyr	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Asp	Lys
210						215					220				
Thr	Met	His	Glu	Leu	Tyr	Leu	Trp	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	Val	Arg	Ala
225					230					235					240
Gly	Val	Gly	Ala	Val	Met	Cys	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ile	Asn	Asn	Ser	Tyr
				245					250					255	
Gly	Cys	Gln	Asn	Ser	Gln	Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu
			260					265					270		
Gly	Phe	Gln	Gly	Phe	Val	Met	Ser	Asp	Trp	Ser	Ala	His	His	Ser	Gly
	275						280					285			
Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Asp	Met	Ser	Met	Pro	Gly	Asp	Ile
290						295					300				
Ser	Phe	Asp	Asp	Gly	Leu	Ser	Phe	Trp	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Val	Ser
305					310					315					320
Val	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Pro	Ala	Trp	Arg	Val	Asp	Asp	Met	Ala	Val
				325					330					335	
Arg	Ile	Met	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Lys	Val	Gly	Arg	Asp	Arg	Leu	Arg	Ile
			340					345					350		
Pro	Pro	Asn	Phe	Ser	Ser	Trp	Thr	Arg	Asp	Glu	Tyr	Gly	Trp	Glu	His
		355					360					365			
Ser	Ala	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Trp	Thr	Lys	Val	Asn	Asp	Phe	Val	Asn
370						375					380				
Val	Gln	Arg	Ser	His	Ser	Gln	Ile	Ile	Arg	Glu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ser
385					390					395					400
Thr	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Lys	Glu
				405					410					415	
Val	Lys	Val	Gly	Val	Leu	Gly	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Asn	Pro	Trp	Gly
			420					425					430		
Ala	Asn	Gly	Cys	Pro	Asp	Arg	Gly	Cys	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Ala	Met
		435					440					445			
Ala	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Asn	Phe	Pro	Tyr	Leu	Val	Thr	Pro	Glu
450						455					460				

ES 2 896 153 T3

Gln Ala Ile Gln Arg Glu Val Ile Ser Asn Gly Gly Asn Val Phe Ala
 465 470 475 480
 Val Thr Asp Asn Gly Ala Leu Ser Gln Met Ala Asp Val Ala Ser Gln
 485 490 495
 Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Phe
 500 505 510
 Ile Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp
 515 520 525
 Lys Asn Gly Glu Ala Val Ile Asp Thr Val Val Ser His Cys Asn Asn
 530 535 540
 Thr Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Arg Trp
 545 550 555 560
 Tyr Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Ile Trp Ala Gly Leu Pro Gly
 565 570 575
 Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
 580 585 590
 Pro Ser Ala Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 595 600 605
 Gly Ala Pro Leu Leu Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 610 615 620
 Asp Asp Phe Asn Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 625 630 635 640
 Arg Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr
 645 650 655
 Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser
 660 665 670
 Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr
 675 680 685
 Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys
 690 695 700
 Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu
 705 710 715 720

ES 2 896 153 T3

Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile
 725 730 735
 Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val
 755 760 765
 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro
 770 775 780
 Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
 785 790 795 800
 Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
 805 810 815
 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
 820 825 830
 Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
 835 840 845
 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
 850 855 860
 <210> 6
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus aculeatus*
 <400> 6
 Met Val Gly Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Leu
 1 5 10 15
 Pro Asn Ile Val Ser Ala Val Gly Leu Asp Gln Ala Ala Val Ala Lys
 20 25 30
 Gly Leu Gln Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp
 35 40 45
 Ile Pro Tyr Val Thr Gln Leu Asn Asn Thr Ala Asp Phe Gly Gln Ile
 50 55 60
 Thr Pro Gly Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly
 65 70 75 80

ES 2 896 153 T3

Thr	Phe	Thr	Phe	Thr	Lys	Gly	Asp	Val	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala	Glu	Gly	85	90	95	
Asn	Gly	Gln	Tyr	Leu	Arg	Cys	His	Thr	Leu	Val	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	100	105	110	
Pro	Ser	Trp	Val	Thr	Ser	Gly	Thr	Trp	Thr	Asn	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	115	120	125	
Ala	Leu	Lys	Asn	His	Ile	Thr	Asn	Val	Val	Ser	His	Tyr	Lys	Gly	Lys	130	135	140	
Cys	Leu	His	Trp	Asp	Val	Val	Asn	Glu	Ala	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly	Thr	145	150	155	160
Tyr	Arg	Thr	Asn	Ile	Phe	Tyr	Thr	Thr	Ile	Gly	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	165	170	175	
Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	Asp	Ala	Lys	Leu	Phe	180	185	190	
Tyr	Asn	Asp	Tyr	Asn	Leu	Glu	Tyr	Gly	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ser	Ala	195	200	205	
Arg	Ala	Ile	Val	Gln	Leu	Val	Lys	Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	Ile	Asp	Gly	210	215	220	
Val	Gly	Leu	Gln	Ala	His	Phe	Ser	Val	Gly	Thr	Val	Pro	Ser	Thr	Ser	225	230	235	240
Ser	Leu	Val	Ser	Val	Leu	Gln	Ser	Phe	Thr	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Val	245	250	255	
Ala	Tyr	Thr	Glu	Ala	Asp	Val	Arg	Ile	Leu	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Thr	260	265	270	
Thr	Leu	Ala	Gln	Gln	Ser	Ser	Asp	Phe	Gln	Ala	Leu	Val	Gln	Ser	Cys	275	280	285	
Val	Gln	Thr	Thr	Gly	Cys	Val	Gly	Phe	Thr	Ile	Trp	Asp	Trp	Thr	Asp	290	295	300	
Lys	Tyr	Ser	Trp	Val	Pro	Ser	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ala	Ala	Leu	305	310	315	320
Pro	Trp	Asp	Glu	Asn	Leu	Val	Lys	Lys	Pro	Ala	Tyr	Asn	Gly	Leu	Leu				

ES 2 896 153 T3

5

```

                                325                                330                                335

Ala Gly Met Gly Val Thr Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala
      340                                345                                350

Thr Ala Thr Gly Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Ser Thr
      355                                360                                365

Gly Thr Thr Ala Ala His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Leu Asn Trp Ser
      370                                375                                380

Gly Pro Thr Ala Cys Ala Thr Gly Tyr Thr Cys Thr Tyr Val Asn Asp
      385                                390                                395                                400

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
      405

<210> 7
<211> 253
<212> PRT
<213> Penicillium emersonii
<400> 7
Met Leu Ser Ser Thr Thr Arg Thr Leu Ala Phe Thr Gly Leu Ala Gly
 1          5          10          15

Leu Leu Ser Ala Pro Leu Val Lys Ala His Gly Phe Val Gln Gly Ile
 20          25          30

Val Ile Gly Asp Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Ile Val Asn Ser Phe Pro
 35          40          45

Tyr Glu Ser Asn Pro Pro Pro Val Ile Gly Trp Ala Thr Thr Ala Thr
 50          55          60

Asp Leu Gly Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Gly Pro Asp Ile Ile
 65          70          75          80

Cys His Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Thr Ala Pro Val Ala Ala
 85          90          95

Gly Gly Thr Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His
 100          105          110

Gly Pro Val Ile Thr Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asn Cys Ser Thr
 115          120          125

Val Asp Lys Thr Thr Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Gln Gln Gly Leu

```

ES 2 896 153 T3

130

135

140

Ile Asp Asp Thr Ser Pro Pro Gly Thr Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile
145 150 155 160

Ala Asn Asn Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Asn Ser Val Ala Pro
165 170 175

Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Asn
180 185 190

Asn Lys Asp Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Ile Glu Val
195 200 205

Thr Gly Gly Gly Ser Asp Ala Pro Glu Gly Thr Leu Gly Glu Asp Leu
210 215 220

Tyr His Asp Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asp Ile Tyr Glu Pro Ile
225 230 235 240

Ala Thr Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Glu Pro Thr Phe
245 250

<210> 8

<211> 397

<212> PRT

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 8

Met Val His Leu Ser Ser Leu Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Leu
1 5 10 15

Val Tyr Gly Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Lys Gly Leu Lys
20 25 30

Tyr Phe Gly Ser Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp Ser Ala Tyr
35 40 45

Val Ala Gln Leu Ser Asn Thr Asp Asp Phe Gly Gln Ile Thr Pro Gly
50 55 60

Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Asn Ser Phe Ser
65 70 75 80

Phe Ala Asn Gly Asp Ala Val Val Asn Leu Ala Asn Lys Asn Gly Gln
85 90 95

Leu Met Arg Cys His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Asn Trp

ES 2 896 153 T3

100	105	110
Val Ser Ser Gly Ser Trp Thr Asn Ala Thr Leu Leu Ala Ala Met Lys		
115	120	125
Asn His Ile Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Lys Cys Tyr Ala		
130	135	140
Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Glu Asp Gly Thr Phe Arg Asn		
145	150	155
Ser Val Phe Tyr Gln Ile Ile Gly Pro Ala Tyr Ile Pro Ile Ala Phe		
165	170	175
Ala Thr Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Val Lys Leu Tyr Tyr Asn Asp		
180	185	190
Tyr Asn Ile Glu Tyr Ser Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala Gln Asn Ile		
195	200	205
Val Lys Met Ile Lys Ala Tyr Gly Ala Lys Ile Asp Gly Val Gly Leu		
210	215	220
Gln Ala His Phe Ile Val Gly Ser Thr Pro Ser Gln Ser Asp Leu Thr		
225	230	235
Thr Val Leu Lys Gly Tyr Thr Ala Leu Gly Val Glu Val Ala Tyr Thr		
245	250	255
Glu Leu Asp Ile Arg Met Gln Leu Pro Ser Thr Ala Ala Lys Leu Ala		
260	265	270
Gln Gln Ser Thr Asp Phe Gln Gly Val Ala Ala Ala Cys Val Ser Thr		
275	280	285
Thr Gly Cys Val Gly Val Thr Ile Trp Asp Trp Thr Asp Lys Tyr Ser		
290	295	300
Trp Val Pro Ser Val Phe Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Leu Pro Trp Asp		
305	310	315
Glu Asn Tyr Val Lys Lys Pro Ala Tyr Asp Gly Leu Met Ala Gly Leu		
325	330	335
Gly Ala Ser Gly Ser Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr		
340	345	350
Thr Thr Gly Gly Thr Asp Pro Thr Gly Val Ala Gln Lys Trp Gly Gln		
355	360	365
Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr		
370	375	380
Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu		
385	390	395

5

<210> 9

<211> 792

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 9

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

Gly Ala Leu Ala Gln Ala Asn Thr Ser Tyr Val Asp Tyr Asn Val Glu
 20 25 30

Ala Asn Pro Asp Leu Thr Pro Gln Ser Val Ala Thr Ile Asp Leu Ser
 35 40 45

Phe Pro Asp Cys Glu Asn Gly Pro Leu Ser Lys Thr Leu Val Cys Asp
 50 55 60

Thr Ser Ala Arg Pro His Asp Arg Ala Ala Ala Leu Val Ser Met Phe
 65 70 75 80

Thr Phe Glu Glu Leu Val Asn Asn Thr Gly Asn Thr Ser Pro Gly Val
 85 90 95

Pro Arg Leu Gly Leu Pro Pro Tyr Gln Val Trp Ser Glu Ala Leu His
 100 105 110

Gly Leu Asp Arg Ala Asn Phe Thr Asn Glu Gly Glu Tyr Ser Trp Ala
 115 120 125

Thr Ser Phe Pro Met Pro Ile Leu Thr Met Ser Ala Leu Asn Arg Thr
 130 135 140

Leu Ile Asn Gln Ile Ala Thr Ile Ile Ala Thr Gln Gly Arg Ala Phe
 145 150 155 160

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

ES 2 896 153 T3

Ala Phe Arg Ser Ala Met Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly Glu
 180 185 190
 Asp Ala Tyr Cys Leu Ala Ser Ala Tyr Ala Tyr Glu Tyr Ile Thr Gly
 195 200 205
 Ile Gln Gly Gly Val Asp Pro Glu His Leu Lys Leu Val Ala Thr Ala
 210 215 220
 Lys His Tyr Ala Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Asp Gly His Ser Arg
 225 230 235 240
 Leu Gly Asn Asp Met Asn Ile Thr Gln Gln Glu Leu Ser Glu Tyr Tyr
 245 250 255
 Thr Pro Gln Phe Leu Val Ala Ala Arg Asp Ala Lys Val His Ser Val
 260 265 270
 Met Cys Ser Tyr Asn Ala Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn Ser
 275 280 285
 Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Arg Asp Thr Phe Gly Phe Val Glu Asp
 290 295 300
 Gly Tyr Val Ser Ser Asp Cys Asp Ser Ala Tyr Asn Val Trp Asn Pro
 305 310 315 320
 His Glu Phe Ala Ala Asn Ile Thr Gly Ala Ala Ala Asp Ser Ile Arg
 325 330 335
 Ala Gly Thr Asp Ile Asp Cys Gly Thr Thr Tyr Gln Tyr Tyr Phe Gly
 340 345 350
 Glu Ala Phe Asp Glu Gln Glu Val Thr Arg Ala Glu Ile Glu Arg Gly
 355 360 365
 Val Ile Arg Leu Tyr Ser Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp Gly
 370 375 380
 Asn Gly Ser Val Tyr Arg Asp Leu Thr Trp Asn Asp Val Val Thr Thr
 385 390 395 400
 Asp Ala Trp Asn Ile Ser Tyr Glu Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Leu
 405 410 415
 Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Pro Leu Ala Lys Ser Val Arg Ser Val
 420 425 430

ES 2 896 153 T3

Ala Leu Ile Gly Pro Trp Met Asn Val Thr Thr Gln Leu Gln Gly Asn
435 440 445

Tyr Phe Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Asn Ala Phe Gln
450 455 460

Asn Ser Asp Phe Asp Val Asn Tyr Ala Phe Gly Thr Asn Ile Ser Ser
465 470 475 480

His Ser Thr Asp Gly Phe Ser Glu Ala Leu Ser Ala Ala Lys Lys Ser
485 490 495

Asp Val Ile Ile Phe Ala Gly Gly Ile Asp Asn Thr Leu Glu Ala Glu
500 505 510

Ala Met Asp Arg Met Asn Ile Thr Trp Pro Gly Asn Gln Leu Gln Leu
515 520 525

Ile Asp Gln Leu Ser Gln Leu Gly Lys Pro Leu Ile Val Leu Gln Met
530 535 540

Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Asn Val
545 550 555 560

Asn Ser Leu Ile Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Gln Ala
565 570 575

Leu Leu Asp Ile Ile Thr Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val
580 585 590

Val Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Ala Thr Gln Phe Pro Ala Thr Asp
595 600 605

Met Ser Leu Arg Pro His Gly Asn Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Met Trp
610 615 620

Tyr Thr Gly Thr Pro Val Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Phe Tyr Thr
625 630 635 640

Thr Phe His Ala Ser Leu Pro Gly Thr Gly Lys Asp Lys Thr Ser Phe
645 650 655

Asn Ile Gln Asp Leu Leu Thr Gln Pro His Pro Gly Phe Ala Asn Val
660 665 670

Glu Gln Met Pro Leu Leu Asn Phe Thr Val Thr Ile Thr Asn Thr Gly
675 680 685

ES 2 896 153 T3

Lys Val Ala Ser Asp Tyr Thr Ala Met Leu Phe Ala Asn Thr Thr Ala
690 695 700

Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg Leu
705 710 715 720

Ala Ser Leu Glu Pro His Arg Ser Gln Thr Met Thr Ile Pro Val Thr
725 730 735

Ile Asp Ser Val Ala Arg Thr Asp Glu Ala Gly Asn Arg Val Leu Tyr
740 745 750

Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Asn Glu Arg Ser Val Val Leu
755 760 765

Gln Phe Val Leu Thr Gly Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Trp Pro Val
770 775 780

Glu Gln Gln Gln Ile Ser Ser Ala
785 790

<210> 10

<211> 532

<212> PRT

<213> Aspergillus fumigatus

<400> 10

Met Leu Ala Ser Thr Phe Ser Tyr Arg Met Tyr Lys Thr Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gln Ala Gln Gln Val Gly Thr Ser
20 25 30

Gln Ala Glu Val His Pro Ser Met Thr Trp Gln Ser Cys Thr Ala Gly
35 40 45

Gly Ser Cys Thr Thr Asn Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp
50 55 60

Arg Trp Val His Lys Val Gly Asp Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn
65 70 75 80

Thr Trp Asp Thr Thr Ile Cys Pro Asp Asp Ala Thr Cys Ala Ser Asn
85 90 95

Cys Ala Leu Glu Gly Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Tyr Gly Val Thr Ala
100 105 110

ES 2 896 153 T3

Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Thr Ser Gln Gln Lys
 115 120 125
 Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Met Met Lys Asp Asp Ser Thr Tyr Glu
 130 135 140
 Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser
 145 150 155 160
 Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp
 165 170 175
 Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe
 195 200 205
 Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp
 210 215 220
 Ala Asn Ala Gly Thr Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp
 225 230 235 240
 Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala Phe Thr Pro His Pro Cys
 245 250 255
 Asp Thr Pro Gly Gln Val Met Cys Thr Gly Asp Ala Cys Gly Gly Thr
 260 265 270
 Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp
 275 280 285
 Phe Asn Ser Phe Arg Gln Gly Asn Lys Thr Phe Tyr Gly Pro Gly Met
 290 295 300
 Thr Val Asp Thr Lys Ser Lys Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr
 305 310 315 320
 Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Thr Leu Lys Glu Ile Lys Arg Phe Tyr
 325 330 335
 Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Asn Ser Glu Ser Thr Trp Thr Gly
 340 345 350
 Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ser

ES 2 896 153 T3

355 360 365
 Leu Phe Gln Asp Gln Asn Val Phe Glu Lys His Gly Gly Leu Glu Gly
 370 375 380
 Met Gly Ala Ala Leu Ala Gln Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp
 385 390 395 400
 Asp Asp His Ser Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Asn Tyr Pro Thr
 405 410 415
 Thr Ala Ser Ser Thr Thr Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Asp Ile
 420 425 430
 Ser Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ala Asn His Pro Asp Ala Tyr
 435 440 445
 Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro Ile Gly Ser Thr Phe Asn
 450 455 460
 Ser Gly Gly Ser Asn Pro Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 465 470 475 480
 Gln Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly Asn Pro Gly Gly Thr Gly
 485 490 495
 Val Ala Gln His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro
 500 505 510
 Thr Thr Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr
 515 520 525
 Ser Gln Cys Leu
 530
 <210> 11
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus
 <400> 11
 Met Lys His Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Thr Leu Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Val Gln Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp
 20 25 30
 Ser Gly Pro Thr Ser Cys Val Ala Gly Ala Ala Cys Ser Thr Leu Asn

ES 2 896 153 T3

35	40	45
Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Ala Thr Ser Thr Thr		
50	55	60
Leu Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ser Gln Thr Thr Thr Lys		
65	70	75
Pro Thr Thr Thr Gly Pro Thr Thr Ser Ala Pro Thr Val Thr Ala Ser		
	85	90
Gly Asn Pro Phe Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Ala Asn Pro Tyr Tyr Ser		
	100	105
Ser Glu Val His Thr Leu Ala Met Pro Ser Leu Pro Ser Ser Leu Gln		
	115	120
Pro Lys Ala Ser Ala Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Val Trp Leu Asp		
	130	135
Val Ala Ala Lys Val Pro Thr Met Gly Thr Tyr Leu Ala Asp Ile Gln		
	145	150
Ala Lys Asn Lys Ala Gly Ala Asn Pro Pro Ile Ala Gly Ile Phe Val		
	165	170
Val Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly		
	180	185
Glu Tyr Ser Ile Ala Asn Asn Gly Val Ala Asn Tyr Lys Ala Tyr Ile		
	195	200
Asp Ala Ile Arg Ala Gln Leu Val Lys Tyr Ser Asp Val His Thr Ile		
	210	215
Leu Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Asn		
	225	230
Val Ala Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr Leu Glu Cys Val Asp		
	245	250
Tyr Ala Leu Lys Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp		
	260	265
Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Leu Gly Pro Ala		
	275	280
		285

ES 2 896 153 T3

Ala Thr Leu Phe Ala Lys Val Tyr Thr Asp Ala Gly Ser Pro Ala Ala
290 295 300

Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Trp Ser Leu
305 310 315 320

Ser Thr Cys Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asp Pro Asn Cys Asp Glu Lys
325 330 335

Lys Tyr Ile Asn Ala Met Ala Pro Leu Leu Lys Glu Ala Gly Phe Asp
340 345 350

Ala His Phe Ile Met Asp Thr Ser Arg Asn Gly Val Gln Pro Thr Lys
355 360 365

Gln Asn Ala Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe Gly
370 375 380

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

Trp Ile Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly Thr Ser Asn Ser Thr Ser
405 410 415

Pro Arg Tyr Asp Ala His Cys Gly Tyr Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala
420 425 430

Pro Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr
435 440 445

Asn Ala Asn Pro Ser Phe
450

<210> 12

<211> 620

<212> PRT

<213> Myceliophthora thermophila

<400> 12

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

Pro Ser Val Ala Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Glu Gln Arg Asp Leu
20 25 30

Leu Val Pro Ile Thr Glu Arg Glu Glu Ala Ala Val Lys Ala Arg Gln
35 40 45

ES 2 896 153 T3

Gln	Ser	Cys	Asn	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Ala	Cys	Trp	Thr	Asp	Gly	Tyr	50	55	60	
Asp	Ile	Asn	Thr	Asp	Tyr	Glu	Val	Asp	Ser	Pro	Asp	Thr	Gly	Val	Val	65	70	75	80
Arg	Pro	Tyr	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Glu	Val	Asp	Asn	Trp	Thr	Gly	Pro	85	90	95	
Asp	Gly	Val	Val	Lys	Glu	Lys	Val	Met	Leu	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	100	105	110	
Gly	Pro	Thr	Ile	Phe	Ala	Asp	Trp	Gly	Asp	Thr	Ile	Gln	Val	Thr	Val	115	120	125	
Ile	Asn	Asn	Leu	Glu	Thr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	His	Trp	His	Gly	Leu	130	135	140	
His	Gln	Lys	Gly	Thr	Asn	Leu	His	Asp	Gly	Ala	Asn	Gly	Ile	Thr	Glu	145	150	155	160
Cys	Pro	Ile	Pro	Pro	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Val	Tyr	Arg	Phe	Lys	Ala	165	170	175	
Gln	Gln	Tyr	Gly	Thr	Ser	Trp	Tyr	His	Ser	His	Phe	Ser	Ala	Gln	Tyr	180	185	190	
Gly	Asn	Gly	Val	Val	Gly	Ala	Ile	Gln	Ile	Asn	Gly	Pro	Ala	Ser	Leu	195	200	205	
Pro	Tyr	Asp	Thr	Asp	Leu	Gly	Val	Phe	Pro	Ile	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	210	215	220	
Ser	Ser	Ala	Asp	Glu	Leu	Val	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Ser	Gly	Ala	Pro	225	230	235	240
Phe	Ser	Asp	Asn	Val	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Ala	Lys	His	Pro	Glu	Thr	245	250	255	
Gly	Glu	Gly	Glu	Tyr	Ala	Asn	Val	Thr	Leu	Thr	Pro	Gly	Arg	Arg	His	260	265	270	
Arg	Leu	Arg	Leu	Ile	Asn	Thr	Ser	Val	Glu	Asn	His	Phe	Gln	Val	Ser	275	280	285	
Leu	Val	Asn	His	Thr	Met	Cys	Ile	Ile	Ala	Ala	Asp	Met	Val	Pro	Val	290	295	300	

ES 2 896 153 T3

Asn Ala Met Thr Val Asp Ser Leu Phe Leu Gly Val Gly Gln Arg Tyr
 305 310 315 320
 Asp Val Val Ile Glu Ala Asn Arg Thr Pro Gly Asn Tyr Trp Phe Asn
 325 330 335
 Val Thr Phe Gly Gly Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Arg Asn Pro Tyr
 340 345 350
 Pro Ala Ala Ile Phe His Tyr Ala Gly Ala Pro Gly Gly Pro Pro Thr
 355 360 365
 Asp Glu Gly Lys Ala Pro Val Asp His Asn Cys Leu Asp Leu Pro Asn
 370 375 380
 Leu Lys Pro Val Val Ala Arg Asp Val Pro Leu Ser Gly Phe Ala Lys
 385 390 395 400
 Arg Ala Asp Asn Thr Leu Asp Val Thr Leu Asp Thr Thr Gly Thr Pro
 405 410 415
 Leu Phe Val Trp Lys Val Asn Gly Ser Ala Ile Asn Ile Asp Trp Gly
 420 425 430
 Arg Ala Val Val Asp Tyr Val Leu Thr Gln Asn Thr Ser Phe Pro Pro
 435 440 445
 Gly Tyr Asn Ile Val Glu Val Asn Gly Ala Asp Gln Trp Ser Tyr Trp
 450 455 460
 Leu Ile Glu Asn Asp Pro Gly Ala Pro Phe Thr Leu Pro His Pro Met
 465 470 475 480
 His Leu His Gly His Asp Phe Tyr Val Leu Gly Arg Ser Pro Asp Glu
 485 490 495
 Ser Pro Ala Ser Asn Glu Arg His Val Phe Asp Pro Ala Arg Asp Ala
 500 505 510
 Gly Leu Leu Ser Gly Ala Asn Pro Val Arg Arg Asp Val Ser Met Leu
 515 520 525
 Pro Ala Phe Gly Trp Val Val Leu Ser Phe Arg Ala Asp Asn Pro Gly
 530 535 540
 Ala Trp Leu Phe His Cys His Ile Ala Trp His Val Ser Gly Gly Leu
 545 550 555 560

ES 2 896 153 T3

Gly Val Val Tyr Leu Glu Arg Ala Asp Asp Leu Arg Gly Ala Val Ser
565 570 575

Asp Ala Asp Ala Asp Asp Leu Asp Arg Leu Cys Ala Asp Trp Arg Arg
580 585 590

Tyr Trp Pro Thr Asn Pro Tyr Pro Lys Ser Asp Ser Gly Leu Lys His
595 600 605

Arg Trp Val Glu Glu Gly Glu Trp Leu Val Lys Ala
610 615 620

<210> 13

<211> 439

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Xilosa Isomerasa Bovina descrita en el documentoUS8586336B

<400> 13

Met Ala Lys Glu Tyr Phe Pro Phe Thr Gly Lys Ile Pro Phe Glu Gly
1 5 10 15

Lys Asp Ser Lys Asn Val Met Ala Phe His Tyr Tyr Glu Pro Glu Lys
20 25 30

Val Val Met Gly Lys Lys Met Lys Asp Trp Leu Lys Phe Ala Met Ala
35 40 45

Trp Trp His Thr Leu Gly Gly Ala Ser Ala Asp Gln Phe Gly Gly Gln
50 55 60

Thr Arg Ser Tyr Glu Trp Asp Lys Ala Glu Cys Pro Val Gln Arg Ala
65 70 75 80

Lys Asp Lys Met Asp Ala Gly Phe Glu Ile Met Asp Lys Leu Gly Ile
85 90 95

Glu Tyr Phe Cys Phe His Asp Val Asp Leu Val Glu Glu Ala Pro Thr
100 105 110

Ile Ala Glu Tyr Glu Glu Arg Met Lys Ala Ile Thr Asp Tyr Ala Gln
115 120 125

Glu Lys Met Lys Gln Phe Pro Asn Ile Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala
130 135 140

ES 2 896 153 T3

Asn Val Phe Gly Asn Lys Arg Tyr Ala Asn Gly Ala Ser Thr Asn Pro
 145 150 155 160
 Asp Phe Asp Val Val Ala Arg Ala Ile Val Gln Ile Lys Asn Ser Ile
 165 170 175
 Asp Ala Thr Ile Lys Leu Gly Gly Thr Asn Tyr Val Phe Trp Gly Gly
 180 185 190
 Arg Glu Gly Tyr Met Ser Leu Leu Asn Thr Asp Gln Lys Arg Glu Lys
 195 200 205
 Glu His Met Ala Thr Met Leu Gly Met Ala Arg Asp Tyr Ala Arg Ala
 210 215 220
 Lys Gly Phe Lys Gly Thr Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Met Glu Pro
 225 230 235 240
 Ser Lys His Gln Tyr Asp Val Asp Thr Glu Thr Val Ile Gly Phe Leu
 245 250 255
 Lys Ala His Gly Leu Asp Lys Asp Phe Lys Val Asn Ile Glu Val Asn
 260 265 270
 His Ala Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Glu His Glu Leu Ala Cys Ala
 275 280 285
 Val Asp Ala Gly Met Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Arg Gly Asp Ala
 290 295 300
 Gln Asn Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Ile Asp Asn Phe Glu Leu
 305 310 315 320
 Thr Gln Ala Met Leu Glu Ile Ile Arg Asn Gly Gly Leu Gly Asn Gly
 325 330 335
 Gly Thr Asn Phe Asp Ala Lys Ile Arg Arg Asn Ser Thr Asp Leu Glu
 340 345 350
 Asp Leu Phe Ile Ala His Ile Ser Gly Met Asp Ala Met Ala Arg Ala
 355 360 365
 Leu Met Asn Ala Ala Asp Ile Leu Glu Asn Ser Glu Leu Pro Ala Met
 370 375 380
 Lys Lys Ala Arg Tyr Ala Ser Phe Asp Ser Gly Ile Gly Lys Asp Phe
 385 390 395 400
 Glu Asp Gly Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr Glu Tyr Gly Lys Lys
 405 410 415
 Val Glu Glu Pro Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Lys Tyr Glu Thr
 420 425 430
 Ile Val Ala Leu His Cys Lys
 435

5

<210> 14

<211> 507

<212> PRT

<213> *Talaromyces leycettanus*

<400> 14

Gln Gln Ala Gly Thr Leu Thr Thr Glu Thr His Pro Ser Leu Thr Trp
 1 5 10 15

Gln Gln Cys Ser Ala Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val
 20 25 30

Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Ser Thr Ser Gly Ser Asn
 35 40 45

Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Ala Thr Leu Cys Pro Asp Asp
 50 55 60

Val Thr Cys Ala Ala Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Gly
 65 70 75 80

Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val
 85 90 95

Thr Gln Ala Ser Gln Lys Asn Val Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Met Glu
 100 105 110

Asn Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr
 115 120 125

Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu
 130 135 140

Tyr Leu Val Ala Met Asp Ala Asp Gly Gly Met Ala Lys Tyr Pro Thr
 145 150 155 160

Asn Lys Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys
 165 170 175

ES 2 896 153 T3

Pro	Arg	Asp	Leu	Lys	Phe	Ile	Asn	Gly	Glu	Ala	Asn	Val	Glu	Gly	Trp	180	185	190
Gln	Pro	Ser	Ser	Asn	Asp	Pro	Asn	Ser	Gly	Ile	Gly	Asn	His	Gly	Ser	195	200	205
Cys	Cys	Ala	Glu	Met	Asp	Ile	Trp	Glu	Ala	Asn	Ser	Ile	Ser	Asn	Ala	210	215	220
Val	Thr	Pro	His	Pro	Cys	Asp	Thr	Pro	Gly	Gln	Val	Met	Cys	Thr	Gly	225	230	235
Asn	Asn	Cys	Gly	Gly	Thr	Tyr	Ser	Thr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gly	Thr	Cys	245	250	255
Asp	Pro	Asp	Gly	Cys	Asp	Phe	Asn	Pro	Tyr	Arg	Met	Gly	Asn	His	Ser	260	265	270
Phe	Tyr	Gly	Pro	Lys	Gln	Ile	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Lys	Phe	Thr	Val	275	280	285
Val	Thr	Gln	Phe	Leu	Thr	Asp	Asp	Gly	Thr	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Ser	290	295	300
Glu	Ile	Arg	Arg	Phe	Tyr	Val	Gln	Asn	Gly	Gln	Val	Ile	Pro	Asn	Ser	305	310	315
Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Ser	Gly	Asn	Ser	Ile	Thr	Thr	Glu	Phe	325	330	335
Cys	Thr	Ala	Gln	Lys	Gln	Ala	Phe	Gly	Asp	Thr	Asp	Asp	Phe	Ser	Lys	340	345	350
His	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Gln	Gly	Met	Val	355	360	365
Leu	Val	Met	Ser	Leu	Trp	Asp	Asp	His	Ala	Ala	Asn	Met	Leu	Trp	Leu	370	375	380
Asp	Ser	Thr	Tyr	Pro	Thr	Asn	Ala	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Gly	Ala	Ala	385	390	395
Arg	Gly	Thr	Cys	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Asp	Val	Glu	Ser	405	410	415
Asn	Asp	Pro	Asn	Ala	Tyr	Val	Val	Tyr	Ser	Asn	Ile	Lys	Val	Gly	Pro			

ES 2 896 153 T3

420 425 430
 Ile Gly Ser Thr Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
 435 440 445
 Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Pro Thr Thr Thr Thr Ser Ser
 450 455 460
 Ala Ser Ser Thr Gly Thr Gly Val Ala Gln His Trp Gly Gln Cys Gly
 465 470 475 480
 Gly Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys Val Ser Pro Tyr Thr Cys
 485 490 495
 Gln Glu Leu Asn Pro Tyr Tyr Tyr Gln Cys Leu
 500 505
 <210> 15
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> *Talaromyces leycettanus*
 <400> 15
 Gln Gln Ala Gly Thr Leu Thr Thr Glu Thr His Pro Ser Leu Thr Trp
 1 5 10 15
 Gln Gln Cys Ser Ala Gly Gly Ser Cys Thr Thr Gln Asn Gly Lys Val
 20 25 30
 Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Val His Ser Thr Ser Gly Ser Asn
 35 40 45
 Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Thr Trp Asp Ala Thr Leu Cys Pro Asp Asp
 50 55 60
 Val Thr Cys Ala Ala Asn Cys Ala Leu Asp Gly Ala Asp Tyr Ser Gly
 65 70 75 80
 Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val
 85 90 95
 Thr Gln Ala Ser Gln Lys Asn Val Gly Ser Arg Leu Tyr Leu Met Glu
 100 105 110
 Asn Asp Thr Thr Tyr Gln Ile Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr
 115 120 125
 Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu

ES 2 896 153 T3

130		135		140
Tyr 145	Leu Val	Ala Met	Asp 150	Ala Asp Gly Gly Met 155
				Ala Lys Tyr Pro Thr 160
Asn 165	Lys Ala Gly	Ala Lys Tyr Gly Thr	Gly 170	Tyr Cys Asp Ser Gln Cys 175
Pro 180	Arg Asp Leu Lys Phe Ile	Asn 185	Gly Glu Ala Asn Val	Glu Gly Trp 190
Gln 195	Pro Ser Ser Asn Asp Pro	Asn 200	Ser Gly Ile Gly	Asn His Gly Ser 205
Cys 210	Cys Ala Glu Met Asp Ile Trp	Glu 215	Ala Asn Ser Ile Ser Asn Ala	
Val 225	Thr Pro His Pro Cys Asp Thr Pro	Gly 230	Gln Val Met Cys Thr Gly	
Asn 245	Asn Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Thr	Thr 250	Arg Tyr Ala Gly Thr Cys	
Asp 260	Pro Asp Gly Cys Asp Phe Asn Pro	Tyr 265	Arg Met Gly Asn His Ser	
Phe 275	Tyr Gly Pro Lys Gln Ile Val Asp Thr Ser Ser	Lys 285	Phe Thr Val	
Val 290	Thr Gln Phe Leu Thr Asp Asp Gly Thr Ser Thr	Gly 300	Thr Leu Ser	
Glu 305	Ile Arg Arg Phe Tyr Val Gln Asn Gly	Gln 315	Val Ile Pro Asn Ser	
Val 325	Ser Thr Ile Ser Gly Val Ser Gly	Asn 330	Ser Ile Thr Thr Glu Phe	
Cys 340	Thr Ala Gln Lys Gln Ala Phe Gly	Asp 345	Thr Asp Asp Phe Ser Lys	
His 355	Gly Gly Leu Ser Gly Met Ser Ala Ala Leu Ser	Gln 365	Gly Met Val	
Leu 370	Val Met Ser Leu Trp Asp Asp His Ala Ala	Asn 380	Met Leu Trp Leu	

ES 2 896 153 T3

Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Ala Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala Ala
385 390 395 400

Arg Gly Thr Cys Asp Ile Ser Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ser
405 410 415

Asn Asp Pro Asn Ala Tyr Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro
420 425 430

Ile Gly Ser Thr Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
435 440 445

Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ser Pro Thr Thr Thr Thr Ser Ser
450 455 460

Ala Ser Ser Thr Gly Thr Gly Val Ala Gln His Trp Gly Gln Cys Gly
465 470 475 480

Gly Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys Val Ser Pro Tyr Thr Cys
485 490 495

Gln Glu Leu Asn Pro Tyr Tyr Tyr Gln Cys Leu
500 505

<210> 16

<211> 385

<212> PRT

<213> *Talaromyces leycettanus*

<400> 16

Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Phe Gly
1 5 10 15

Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp Ser Thr Tyr Met Gln Glu
20 25 30

Thr Asp Asn Thr Asp Asp Phe Gly Gln Leu Thr Pro Ala Asn Ser Met
35 40 45

Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Asn Thr Phe Thr Phe Thr Asn
50 55 60

Gly Asp Gln Ile Ala Asn Leu Ala Lys Ser Asn Gly Gln Met Leu Arg
65 70 75 80

Cys His Asn Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu Pro Ser Trp Val Thr Ser
85 90 95

ES 2 896 153 T3

Gly Ser Trp Thr Asn Ala Thr Leu Leu Ala Ala Met Lys Asn His Ile
 100 105 110
 Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Gln Cys Tyr Ala Trp Asp Val
 115 120 125
 Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr Tyr Arg Ser Asn Val Phe
 130 135 140
 Tyr Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro Ile Ala Phe Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile
 165 170 175
 Glu Tyr Pro Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala Gln Asn Ile Val Lys Met
 180 185 190
 Val Lys Ala Tyr Gly Ala Lys Ile Asp Gly Val Gly Leu Gln Ser His
 195 200 205
 Phe Ile Val Gly Ser Thr Pro Ser Gln Ser Ser Gln Gln Ser Asn Met
 210 215 220
 Ala Ala Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp
 225 230 235 240
 Ile Arg Met Thr Leu Pro Ser Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gln Gln Ser
 245 250 255
 Thr Asp Tyr Gln Ser Thr Val Ser Ala Cys Val Asn Thr Pro Lys Cys
 260 265 270
 Ile Gly Ile Thr Leu Trp Asp Trp Thr Asp Lys Tyr Ser Trp Val Pro
 275 280 285
 Asn Thr Phe Ser Gly Gln Gly Asp Ala Cys Pro Trp Asp Ser Asn Tyr
 290 295 300
 Gln Lys Lys Pro Ala Tyr Tyr Gly Ile Leu Thr Ala Leu Gly Gly Ser
 305 310 315 320
 Ala Ser Thr Ser Thr Thr Thr Thr Leu Val Thr Ser Thr Arg Thr Ser
 325 330 335
 Thr Thr Thr Ser Thr Ser Ala Thr Ser Thr Ser Thr Gly Val Ala Gln
 340 345 350
 His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys
 355 360 365
 Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Glu Leu Asn Pro Tyr Tyr Tyr Gln Cys
 370 375 380
 Leu
 385

5

<210> 17

<211> 775

<212> PRT

<213> *Talaromyces emersonii*

<400> 17

Gln Asp Asn Gln Thr Tyr Ala Asn Tyr Ser Ser Gln Ser Gln Pro Asp
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Arg Thr Val Ala Thr Ile Asp Leu Ser Phe Pro Asp Cys
 20 25 30

Glu Asn Gly Pro Leu Ser Thr Asn Leu Val Cys Asn Lys Ser Ala Asp
 35 40 45

Pro Trp Ala Arg Ala Glu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Thr Leu Glu Glu
 50 55 60

Leu Ile Asn Asn Thr Gln Asn Thr Ala Pro Gly Val Pro Arg Leu Gly
 65 70 75 80

Leu Pro Gln Tyr Gln Val Trp Asn Glu Ala Leu His Gly Leu Asp Arg
 85 90 95

Ala Asn Phe Ser His Ser Gly Glu Tyr Ser Trp Ala Thr Ser Phe Pro
 100 105 110

Met Pro Ile Leu Ser Met Ala Ser Phe Asn Arg Thr Leu Ile Asn Gln
 115 120 125

Ile Ala Ser Ile Ile Ala Thr Gln Ala Arg Ala Phe Asn Asn Ala Gly
 130 135 140

Arg Tyr Gly Leu Asp Ser Tyr Ala Pro Asn Ile Asn Gly Phe Arg Ser
 145 150 155 160

Pro Leu Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly Glu Asp Ala Phe Phe
 165 170 175

ES 2 896 153 T3

Leu Ser Ser Thr Tyr Ala Tyr Glu Tyr Ile Thr Gly Leu Gln Gly Gly
 180 185 190

Val Asp Pro Glu His Val Lys Ile Val Ala Thr Ala Lys His Phe Ala
 195 200 205

Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Gly Asn Val Ser Arg Leu Gly Phe Asn
 210 215 220

Ala Ile Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ser Glu Tyr Tyr Thr Pro Gln Phe
 225 230 235 240

Leu Ala Ser Ala Arg Tyr Ala Lys Thr Arg Ser Ile Met Cys Ser Tyr
 245 250 255

Asn Ala Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn Ser Phe Phe Leu Gln
 260 265 270

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

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

Leu Asn Gln Ser Gly Ala Ala Ala Asp Ser Leu Leu Ala Gly Thr Asp
 305 310 315 320

Ile Asp Cys Gly Gln Thr Leu Pro Trp His Leu Asn Glu Ser Phe Val
 325 330 335

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

Tyr Ser Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp Gly Asn Asn Ser Glu
 355 360 365

Tyr Arg Asn Leu Asn Trp Asn Asp Val Val Thr Thr Asp Ala Trp Asn
 370 375 380

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

Gly Thr Leu Pro Leu Ser Lys Lys Val Arg Ser Ile Ala Leu Ile Gly
 405 410 415

Pro Trp Ala Asn Ala Thr Val Gln Met Gln Gly Asn Tyr Tyr Gly Thr
 420 425 430

ES 2 896 153 T3

Pro Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Glu Ala Ala Lys Ala Ser Gly Phe
 435 440 445
 Thr Val Asn Tyr Ala Phe Gly Thr Asn Ile Ser Thr Asp Ser Thr Gln
 450 455 460
 Trp Phe Ala Glu Ala Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ser Asp Val Ile Ile
 465 470 475 480
 Tyr Ala Gly Gly Ile Asp Asn Thr Ile Glu Ala Glu Gly Gln Asp Arg
 485 490 495
 Thr Asp Leu Lys Trp Pro Gly Asn Gln Leu Asp Leu Ile Glu Gln Leu
 500 505 510
 Ser Gln Val Gly Lys Pro Leu Val Val Leu Gln Met Gly Gly Gly Gln
 515 520 525
 Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ala Asn Lys Asn Val Asn Ala Leu Val
 530 535 540
 Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Ala Ala Leu Phe Asp Ile
 545 550 555 560
 Leu Thr Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val Ser Thr Gln Tyr
 565 570 575
 Pro Ala Glu Tyr Ala Thr Gln Phe Pro Ala Asn Asp Met Asn Leu Arg
 580 585 590
 Pro Asn Gly Ser Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Ile Trp Tyr Thr Gly Thr
 595 600 605
 Pro Val Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Phe Tyr Thr Glu Phe Gln Glu
 610 615 620
 Ser Ala Ala Ala Gly Thr Asn Lys Thr Ser Thr Phe Asp Ile Leu Asp
 625 630 635 640
 Leu Phe Ser Thr Pro His Pro Gly Tyr Glu Tyr Ile Glu Gln Val Pro
 645 650 655
 Phe Ile Asn Val Thr Val Asp Val Lys Asn Val Gly His Thr Pro Ser
 660 665 670
 Pro Tyr Thr Gly Leu Leu Phe Ala Asn Thr Thr Ala Gly Pro Lys Pro

ES 2 896 153 T3

675

680

685

Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Trp Leu Pro Thr Ile Gln
690 695 700

Pro Gly Glu Thr Ala Lys Leu Thr Ile Pro Val Pro Leu Gly Ala Ile
705 710 715 720

Ala Trp Ala Asp Glu Asn Gly Asn Lys Val Val Phe Pro Gly Asn Tyr
725 730 735

Glu Leu Ala Leu Asn Asn Glu Arg Ser Val Val Val Ser Phe Thr Leu
740 745 750

Thr Gly Asp Ala Ala Thr Leu Glu Lys Trp Pro Leu Trp Glu Gln Ala
755 760 765

Val Pro Gly Val Leu Gln Gln
770 775

<210> 18

<211> 1644

<212> ADN

<213> Candida intermedia

<400> 18

atgtcacaa	actctcactc	atcaggtgcc	gcaaccccag	taaatggtag	tatattagaa	60
aaggaaaagg	aagactctcc	agtattgcaa	gtagatgccc	cacaaaagg	ttttaaggac	120
tacatagtta	tctctatctt	ctgtttcatg	gtagcattcg	gtggtttcgt	ttttggtttc	180
gatacaggta	ccataagtgg	tttcgttaac	atgtctgatt	tcaaagacag	attcgggtcaa	240
catcacgctg	atggtagacc	ttacttgagt	gacgttagag	tcggtttgat	gatctctatt	300
ttcaatgttg	gttggtccgt	cggtggtatt	ttcttggtga	aagtagctga	tgtttggggt	360
agaagaatag	gtttgatgtt	ctctatggct	gtttacgttg	tcggtatcat	catccaaatc	420
tcttcatcca	ccaagtggta	ccaatttttc	atcggtagat	taattgccgg	tttagctgtc	480
ggtagctgt	gtgtagtttc	tccattgttt	atatcagaag	tttcccctaa	acaaatcaga	540
ggtagattgg	tctgttgctt	ccaattgtgt	ataaccttgg	gtatcttctt	aggttattgc	600
actacatacg	gtactaagac	atataccgat	tctagacaat	ggagaatccc	attgggttta	660
tgttttgcat	gggcatatt	gttagtcgta	ggcatgttga	atatgccaga	atcacctaga	720
tatttggttg	aaaagcatag	aatcgatgaa	gcaaagagaa	gtatagccag	atctaacaaa	780
atcccagaag	aagacccttt	cgtatacaca	gaagttcaat	tgatacaagc	aggtatagaa	840
agagaagctt	tggcaggtca	agcctcatgg	aaggaattga	taacaggtaa	acctaagatt	900

```

tttagaagag ttataatggg tatcatgttg caatctttgc aacaattgac tggtgacaac      96(
tatttcctttt attacggtac cactatatatt caagctgtcg gtttgaaaga ctcatccaa      102(
acctccatca tcttgggtat cgttaacttc gcatcaactt tcgtcgggtat ctatgtaatc      108(
gaaagattgg gtagaagatt atgtttgttg acaggtagtg ctgcaatgtt catatgcttc      114(
atcatctatt ctttgatagg taccacaacat ttgtacaagc aaggttacag taacgaaact      120(
tctaacacat acaaggcatc tggtaacgcc atgatcttta ttacttgttt gtacattttc      126(
tttttcgctt ccacatgggc aggtgggtgtt tattgcataa tcagtgaatc ttaccatta      132(
agaatcagat caaaggccat gtccattgct actgccgcta actggttggtg gggtttctta      138(
atctcattct ttaccctttt tatcacttcc gctattcact tctattacgg ttttgttttc      144(
actggttggt tggcattttc tttcttttat gtttacttct ttgtctacga aacaaagggt      150(
ttgtcattgg aagaagtcga tgaaatgtac gcttccggtg tattgccatt aaagtcagca      156(
tcctgggttc cacctaattt ggaacacatg gctcactccg ctgggttacgc tgggtctgat      162(
aaggcaactg atgaacaagt ctga      164(

```

<210> 19

<211> 724

<212> PRT

<213> *Thermoascus aurantiacus*

<400> 19

```

Ala Cys Pro Tyr Met Thr Gly Glu Leu Pro Arg Ser Phe Ala Glu Asn
1           5           10           15

```

```

Pro His Ala Ile Asn Arg Arg Ala Glu Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala
          20           25           30

```

```

Glu Thr Glu Lys Phe Leu Ser Gln Phe Tyr Leu Asn Asp Asn Asp Thr
          35           40           45

```

```

Phe Met Thr Thr Asp Val Gly Gly Pro Ile Glu Asp Gln Asn Ser Leu
          50           55           60

```

```

Ser Ala Gly Asp Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Arg
65           70           75           80

```

```

Gln Lys Ile Gln Arg Phe Asp His Glu Arg Val Pro Glu Arg Ala Val
          85           90           95

```

```

His Ala Arg Gly Ala Gly Ala His Gly Val Phe Thr Ser Tyr Ala Asp
          100          105          110

```

```

Trp Ser Asn Ile Thr Ala Ala Ser Phe Leu Ser Ala Ala Gly Lys Glu

```

5

ES 2 896 153 T3

115		120		125
Thr Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Ala Gly Ser Arg Gly Ser				
130		135		140
Ala Asp Thr Ala Arg Asp Val His Gly Phe Ala Thr Arg Phe Tyr Thr				
145		150		155
Asp Glu Gly Asn Phe Asp Ile Val Gly Asn Asn Ile Pro Val Phe Phe				
		165		170
Ile Gln Asp Ala Ile Gln Phe Pro Asp Leu Ile His Ala Val Lys Pro				
		180		185
Ser Pro Asn Asn Glu Ile Pro Gln Ala Ala Thr Ala His Asp Ser Ala				
		195		200
Trp Asp Phe Phe Ser Gln Gln Pro Ser Ser Leu His Thr Leu Phe Trp				
		210		215
Ala Met Ala Gly His Gly Ile Pro Arg Ser Tyr Arg Asn Met Asp Gly				
225		230		235
Phe Gly Ile His Thr Phe Arg Phe Val Thr Asp Asp Gly Ala Ser Lys				
		245		250
Leu Val Lys Phe His Trp Thr Ser Leu Gln Gly Lys Ala Ser Leu Val				
		260		265
Trp Glu Glu Ala Gln Ala Val Ala Gly Lys Asn Ala Asp Tyr His Arg				
		275		280
Gln Asp Leu Trp Asp Ala Ile Glu Ala Gly Arg Tyr Pro Glu Trp Glu				
		290		295
Leu Gly Val Gln Ile Met Asp Glu Glu Asp Gln Leu Arg Phe Gly Phe				
305		310		315
Asp Leu Leu Asp Pro Thr Lys Ile Val Pro Glu Glu Tyr Val Pro Ile				
		325		330
Thr Lys Leu Gly Lys Met Gln Leu Asn Arg Asn Pro Leu Asn Tyr Phe				
		340		345
Ala Glu Thr Glu Gln Ile Met Phe Gln Pro Gly His Val Val Arg Gly				
		355		360

ES 2 896 153 T3

Ile Asp Phe Thr Glu Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr
 370 375 380
 Leu Asp Thr Gln Leu Asn Arg His Gly Gly Pro Asn Phe Glu Gln Ile
 385 390 395 400
 Pro Ile Asn Arg Pro Arg Thr Pro Ile His Asn Asn Asn Arg Asp Gly
 405 410 415
 Ala Ala Gln Met Tyr Ile Pro Leu Asn Lys Ala Ala Tyr Thr Pro Asn
 420 425 430
 Thr Leu Asn Asn Gly Ser Pro Lys Gln Ala Asn Gln Thr Val Gly Lys
 435 440 445
 Gly Phe Phe Thr Thr Pro Gly Arg Thr Ala Ser Gly Arg Leu Val Arg
 450 455 460
 Ala Val Ser Ser Thr Phe Ala Asp Val Trp Ser Gln Pro Arg Leu Phe
 465 470 475 480
 Tyr Asn Ser Leu Val Pro Ala Glu Gln Gln Phe Leu Ile Asn Ala Ile
 485 490 495
 Arg Phe Glu Thr Ala His Ile Thr Ser Asp Val Val Lys Asn Asn Val
 500 505 510
 Ile Ile Gln Leu Asn Arg Val Ser Asn Asn Leu Ala Lys Arg Val Ala
 515 520 525
 Arg Ala Ile Gly Val Ala Glu Pro Glu Pro Asp Pro Thr Leu Tyr His
 530 535 540
 Asn Asn Lys Thr Ala Asn Val Gly Val Phe Gly Lys Pro Leu Ala Arg
 545 550 555 560
 Leu Asp Gly Leu Gln Val Gly Val Leu Ala Thr Val Asn Lys Pro Asp
 565 570 575
 Ser Ile Lys Gln Ala Ala Ser Leu Lys Ala Ser Phe Ala Ala Asp Asn
 580 585 590
 Val Asp Val Lys Val Val Ala Glu Arg Leu Ala Asp Gly Val Asp Glu
 595 600 605
 Thr Tyr Ser Ala Ala Asp Ala Val Asn Phe Asp Ala Ile Leu Val Ala
 610 615 620

ES 2 896 153 T3

Asn Gly Ala Glu Gly Leu Phe Ala Arg Asp Ser Phe Thr Ala Arg Pro
625 630 635 640

Ala Asn Ser Thr Thr Ala Thr Leu Tyr Pro Ala Gly Arg Pro Leu Gln
645 650 655

Ile Leu Val Asp Gly Phe Arg Tyr Gly Lys Pro Val Gly Ala Leu Gly
660 665 670

Ser Gly Ala Lys Ala Leu Asp Ala Ala Glu Ile Ser Thr Thr Arg Ala
675 680 685

Gly Val Tyr Val Ala Asn Ser Thr Thr Asp Ser Phe Ile Asn Gly Val
690 695 700

Arg Asp Gly Leu Arg Thr Phe Lys Phe Leu Asp Arg Phe Ala Ile Asp
705 710 715 720

Glu Asp Ala Glu

<210> 20

<211> 1320

<212> ADN

<213> Bovino

<400> 20

atggcaaaag aatattttcc gtttactggt aaaattcctt tcgagggaaa ggatagtaaa	60
aatgtaatgg ctttcatta ttacgagccc gagaaagtcg tgatgggaaa gaagatgaag	120
gactggctga agttcgcaat ggcctggtgg cacacactgg gaggcgcttc tgcagaccag	180
ttcggtggtc aaactcgcag ctatgagtgg gacaaggctg aatgccccgt acagcgtgca	240
aaggataaga tggacgctgg ttctcgagatc atggataagc tgggtatcga gtactttctgc	300
ttccacgatg tagacctcgt tgaggaggct cccaccatcg ctgagtacga ggagcgcgatg	360
aaggccatca ccgactacgc tcaggagaag atgaagcagt tccccaatat caagctgctc	420
tggggtaaccg caaacgtatt cggcaacaag cgttatgcc aatggcgcttc taccaacccc	480
gatttcgatg tggttgctcg tgcgattgtt cagatcaaga actctatcga cgctaccatc	540
aagcttggtg gtaccaacta tgtgttctgg ggtggctcgtg agggctacat gagcctgttg	600
aacaccgacc agaagcgtga gaaggagcac atggctacga tgctgggtat ggctcgtgac	660
tatgctcgcg ctaagggatt caagggtagc ttctgtattg agccgaagcc gatggagcct	720
tcaaagcacc agtatgatgt ggacacagag accgtgattg gcttcctgaa ggcacatggt	780
ctggataagg acttcaaggt gaacatcgag gtgaaccacg ctacattggc tggtcacacc	840

ttcgagcacg aactggcttg tgctgttgac gctggtatgc tgggttctat cgacgctaac 90(
 cgcggtgatg cccagaacgg ctgggatacc gaccagttcc ccatcgacaa ctttgagctg 96(
 acacaggcta tgctggagat catccgcaac ggtggtctgg gcaatggcgg taccaatttc 102(
 gacgccaaga tccgtcgtaa ttctaccgac ctcgaggatc tcttcacgc tcatatcagc 108(
 ggtatggatg ccatggcccg cgccctgatg aatgcagccg atattcttga gaactctgaa 114(
 ctgcccgcaa tgaagaaggc tcgctacgca agcttcgaca gcggtatcgg taaggacttc 120(
 gaggatggca agctgacctt cgagcaggtt tacgagtatg gtaagaaggt tgaagagccg 126(
 aagcagacct ctggcaagca ggagaagtac gagacaatcg tcgccctcca ctgcaaataa 132(
 <210> 21

<211> 437

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<220>

<221> Péptido maduro

<222> (1)..(437)

<400> 21

Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val His Pro Lys Leu Thr Thr
 1 5 10 15

Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val Ala Gln Asp Thr Ser Val
 20 25 30

Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His Asp Ala Asn Tyr Asn Ser
 35 40 45

Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr Leu Cys Pro Asp Glu Ala
 50 55 60

Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly Val Asp Tyr Ala Ala Ser
 65 70 75 80

Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Met Asn Gln Tyr Met Pro
 85 90 95

Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser Pro Arg Leu Tyr Leu Leu
 100 105 110

Asp Ser Asp Gly Glu Tyr Val Met Leu Lys Leu Asn Gly Gln Glu Leu
 115 120 125

Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Ala Leu Pro Cys Gly Glu Asn Gly Ser
 130 135 140

5

10

ES 2 896 153 T3

Leu Tyr Leu Ser Gln Met Asp Glu Asn Gly Gly Ala Asn Gln Tyr Asn
 145 150 155 160
 Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro
 165 170 175
 Val Gln Thr Trp Arg Asn Gly Thr Leu Asn Thr Ser His Gln Gly Phe
 180 185 190
 Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu Gly Asn Ser Arg Ala Asn Ala
 195 200 205
 Leu Thr Pro His Ser Cys Thr Ala Thr Ala Cys Asp Ser Ala Gly Cys
 210 215 220
 Gly Phe Asn Pro Tyr Gly Ser Gly Tyr Lys Ser Tyr Tyr Gly Pro Gly
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Asp Thr Ser Lys Thr Phe Thr Ile Ile Thr Gln Phe Asn
 245 250 255
 Thr Asp Asn Gly Ser Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Ile Thr Arg Lys
 260 265 270
 Tyr Gln Gln Asn Gly Val Asp Ile Pro Ser Ala Gln Pro Gly Gly Asp
 275 280 285
 Thr Ile Ser Ser Cys Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Gly Gly Leu Ala Thr
 290 295 300
 Met Gly Lys Ala Leu Ser Ser Gly Met Val Leu Val Phe Ser Ile Trp
 305 310 315 320
 Asn Asp Asn Ser Gln Tyr Met Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly
 325 330 335
 Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly Asn Pro Ser Asn Ile Leu Ala Asn Asn
 340 345 350
 Pro Asn Thr His Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly
 355 360 365
 Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ser Ser Thr
 370 375 380
 Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser Pro Ser

ES 2 896 153 T3

385 390 395 400

Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly
405 410 415

Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys Gln Tyr Ser Asn Asp Tyr
420 425 430

Tyr Ser Gln Cys Leu
435

<210> 22

<211> 397

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

<220>

<221> Péptido maduro

<222> (1)..(397)

<400> 22

Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro
1 5 10 15

Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr Leu Asn Pro Tyr Tyr
20 25 30

Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr Thr Ser Thr Arg Pro
35 40 45

Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala Gly Val Asn Ile Ala
65 70 75 80

Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr Cys Val Thr Ser Lys
85 90 95

Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser Asn Asn Tyr Pro Asp
100 105 110

Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp Asp Gly Met Thr Ile
115 120 125

Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn Leu Gly
130 135 140

5

10

ES 2 896 153 T3

Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr Asp Gln Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val Asp Ile His Asn Tyr
 165 170 175
 Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala
 180 185 190
 Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala Ser Gln
 195 200 205
 Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val Asn Ile
 210 215 220
 Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile Arg Asn
 225 230 235 240
 Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp Trp Gln
 245 250 255
 Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Gln
 260 265 270
 Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His
 275 280 285
 Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Thr Thr
 290 295 300
 Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Gln
 305 310 315 320
 Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Gln
 325 330 335
 Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn Gln Asn
 340 345 350
 Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp
 355 360 365
 Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly Ser Gly Asn Ser Trp
 370 375 380
 Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys
 385 390 395

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir etanol, que comprende:

(a) sacarificar un material celulósico con una composición de enzima celulolítica;

(b) fermentar el material celulósico sacarificado con un microorganismo fermentador para producir el producto de fermentación; en el que el organismo fermentador es *Saccharomyces cerevisiae* CIBTS1260 (depositado con el número de acceso NRRL Y-50973 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Illinois 61604 EE.UU.).

2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende recuperar el producto de fermentación de la fermentación.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el material celulósico se pretrata.

4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la composición de enzima celulolítica comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, un polipéptido AA9, una hemicelulasa, una CIP, una esterasa, una expansina, una enzima ligninolítica, una oxidorreductasa, una pectinasa, una proteasa, y una swollenina.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la celulasa es una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

6. El procedimiento de la reivindicación 4 o 5, en el que la hemicelulasa es una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una xilanasa, una acetilxilano esterasa, una feruloil esterasa, una arabinofuranosidasa, una xilosidasa, y una glucuronidasa.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las etapas (a) y (b) se realizan simultáneamente en una sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las etapas (a) y (b) se realizan secuencialmente (SHF).

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el material celulósico se pretrata antes de la sacarificación.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el pretratamiento es un pretratamiento con ácido diluido.

11. Un organismo recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* CIBTS1260, depositado con el número de acceso NRRL Y-50973 en la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Illinois 61604 EE.UU.

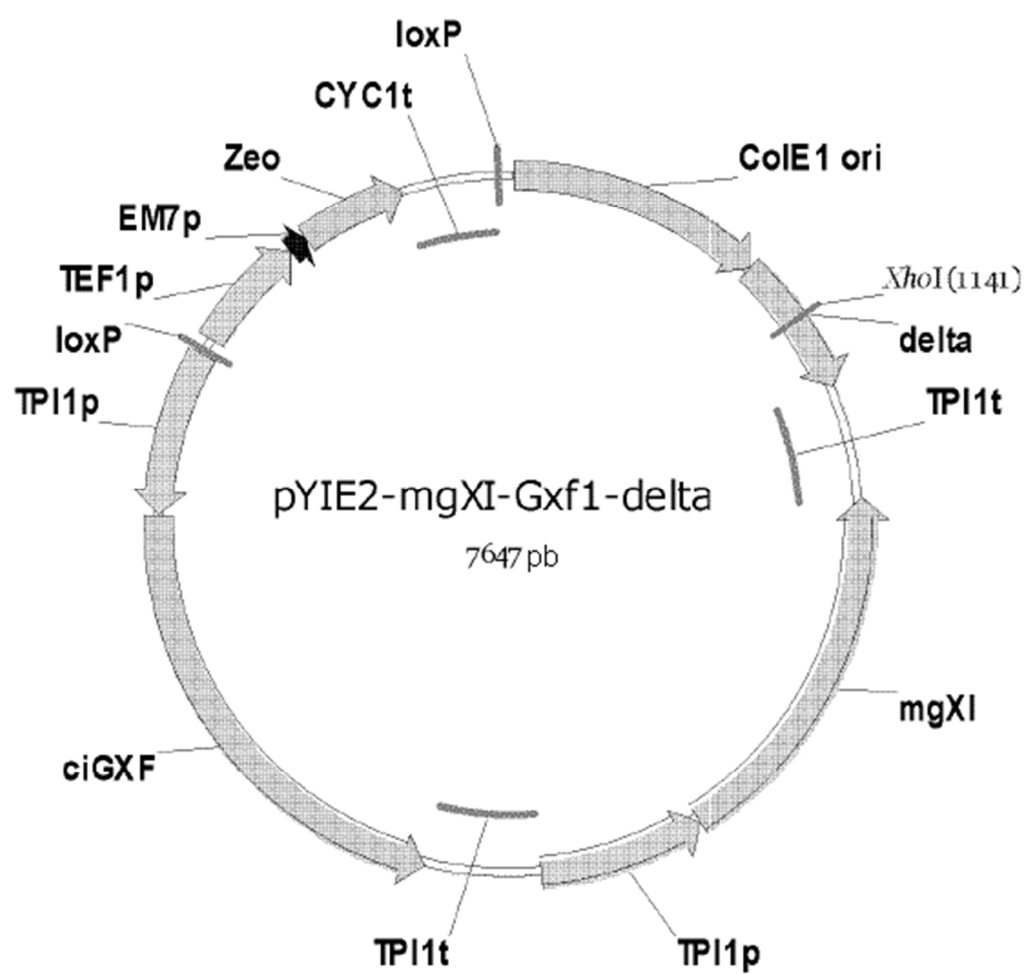


Fig. 1

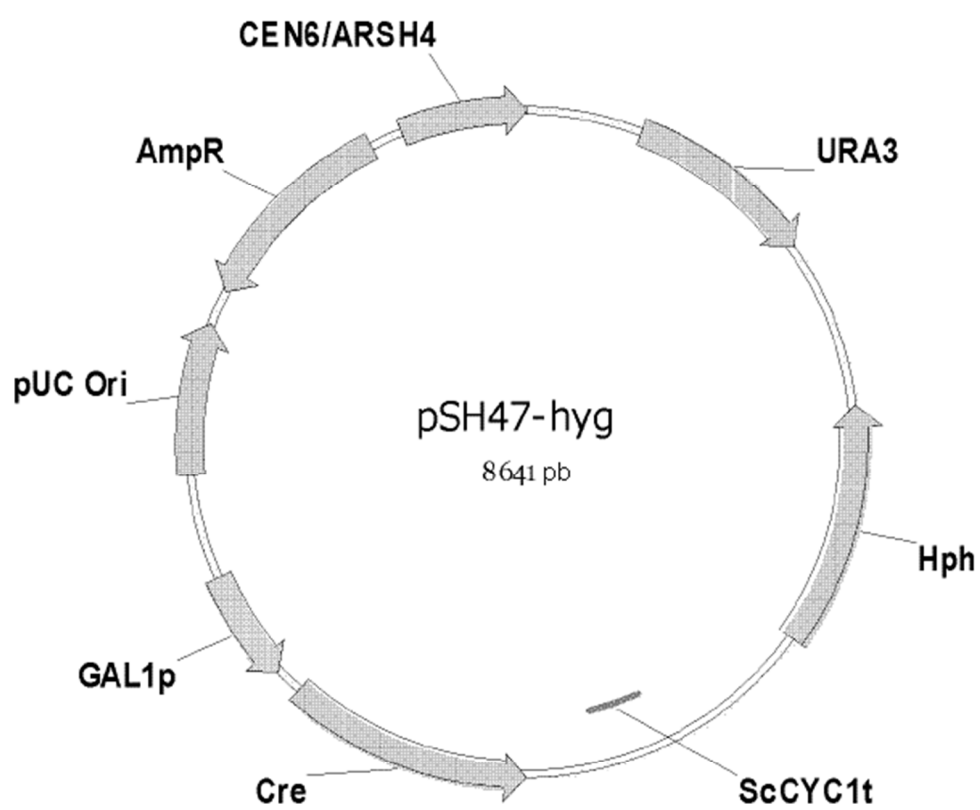


Fig. 2

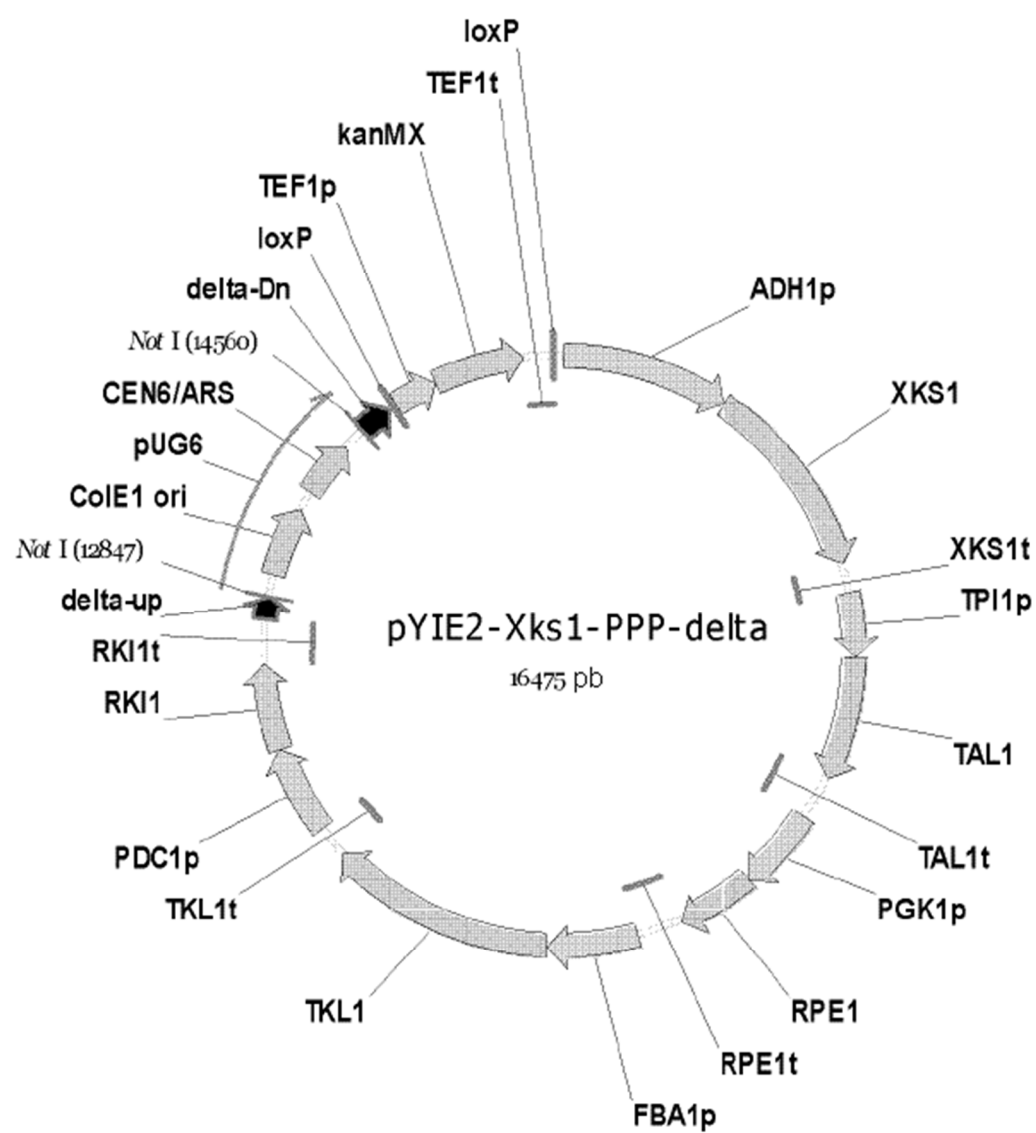


Fig. 3

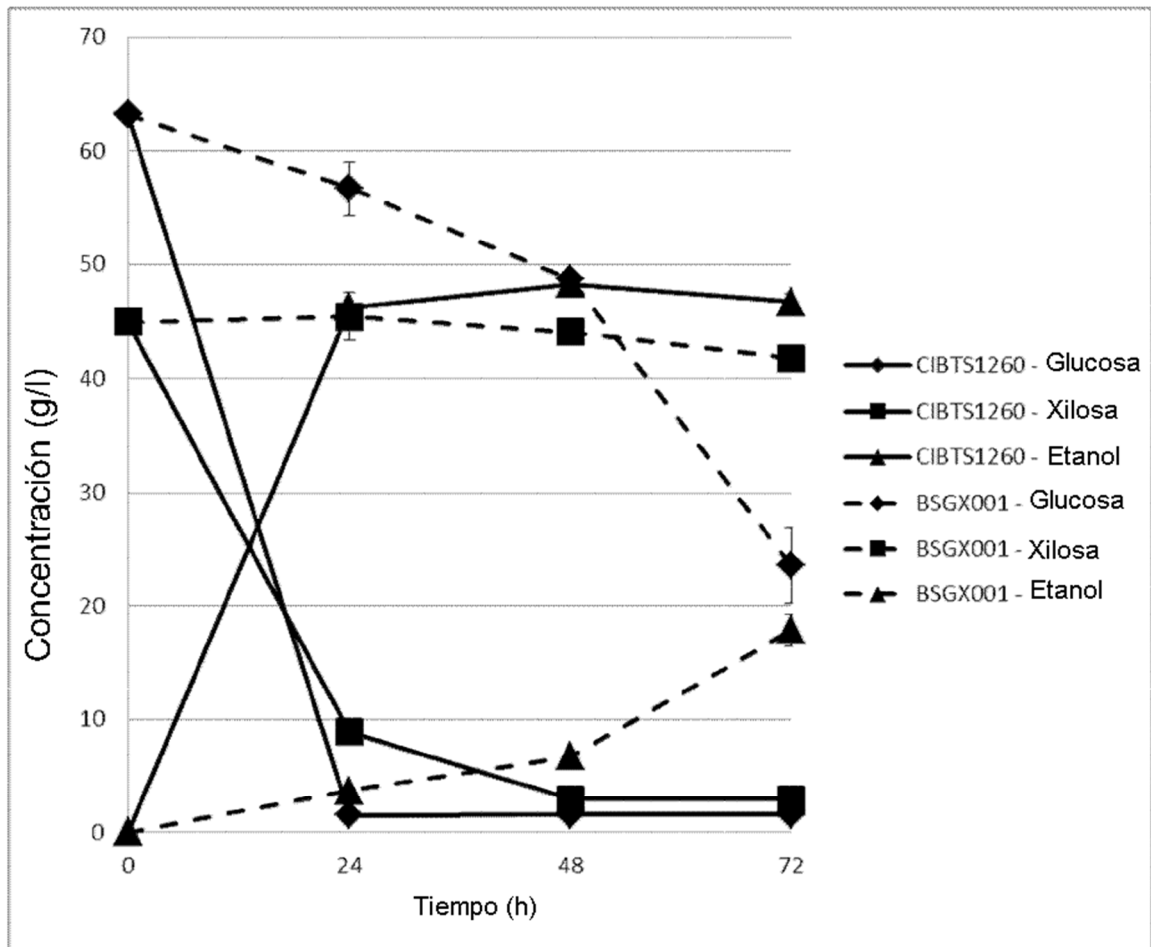


Fig. 4

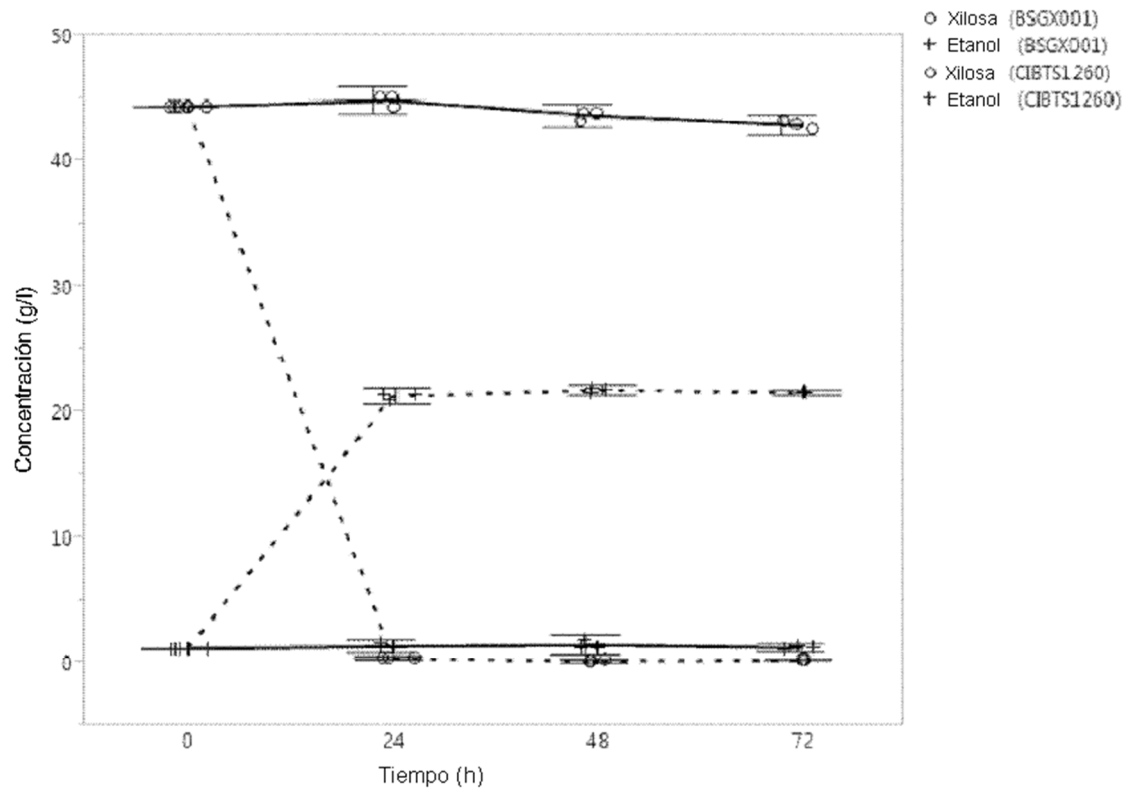


Fig. 5

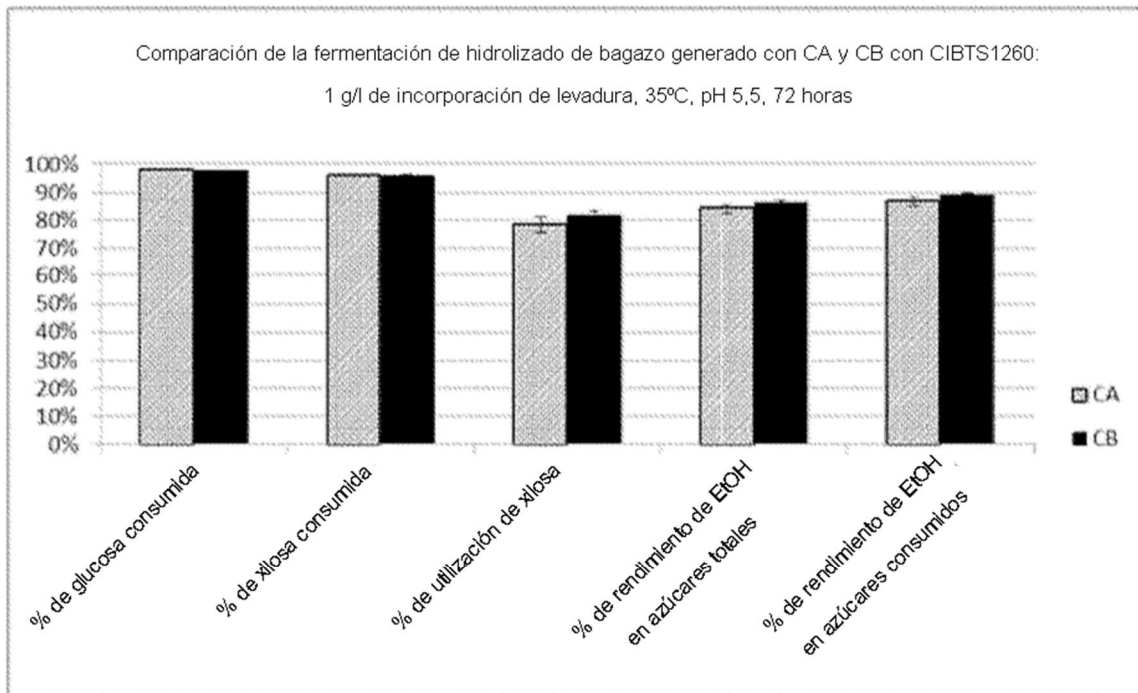
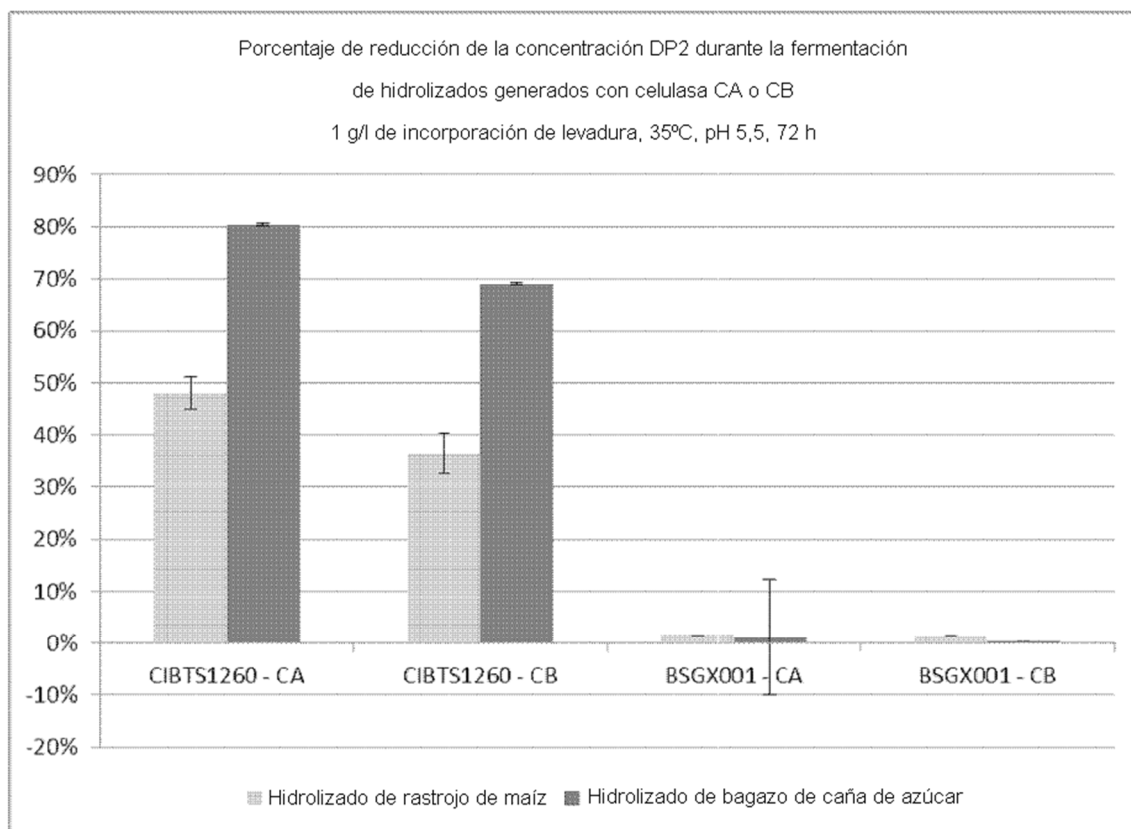


Fig. 6

**Fig. 7**