

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 114**

51 Int. Cl.:

C12N 1/15	(2006.01)
C12N 1/22	(2006.01)
C12N 9/04	(2006.01)
C12N 9/42	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/12	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C12P 7/10	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2011 PCT/US2011/058780**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061382**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2011 E 11838676 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2635671**

54 Título: **Cepas de hongos mejoradas**

30 Prioridad:

16.06.2011 US 201161497661 P
02.11.2010 US 409480 P
02.11.2010 US 409472 P
02.11.2010 US 409217 P
02.11.2010 US 409186 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2017

73 Titular/es:

CODEXIS, INC. (100.0%)
200 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

BAIDYAROY, DIPNATH y
DHAWAN, ISH, KUMAR

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 604 114 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).

Cepas de hongos mejoradas**Descripción**5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a cepas de hongos mejoradas. En algunas formas de realización, las cepas de hongos mejoradas encuentran uso en la hidrólisis de material celulósico a glucosa.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La celulosa es un polímero de la glucosa de azúcar simple vinculada por enlaces beta-1,4 glucosídicos. Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos beta-vinculados. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas. Endoglucanasas digieren el polímero de celulosa en lugares aleatorios, abriéndolo al ataque por celobiohidrolasas.

[0003] Moléculas de liberación secuencial de celobiohidrolasas de celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. Celobiosa es un dímero unido beta-1,4 soluble en agua de la glucosa. Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa a glucosa.

[0004] La conversión de materias primas lignocelulósicas en etanol tiene las ventajas de fácil disponibilidad de grandes cantidades de materia prima, la conveniencia de evitar la quema o entierro de los materiales, y la producción total de gas de efecto invernadero. Madera, residuos agrícolas, cultivos herbáceos y residuos sólidos municipales han sido considerados como materias primas para la producción de etanol. Estos materiales consisten principalmente en celulosa, hemicelulosa, y lignina. Una vez que la celulosa se convierte en glucosa, la glucosa es fácilmente fermentada por levadura en etanol.

[0005] El documento WO 2009/033071 da a conocer enzimas de hongos para la conversión de biomasa en azúcares, que incluyen el uso de *Myceliophthora thermophila cdh1* como una enzima accesoria. WO 2011/066457 da a conocer mezclas de enzimas aisladas a partir de *Myceliophthora thermophila*. WO 2010/080407 estudió el efecto de la adición exógena de *Myceliophthora thermophila* CDH1 a una mezcla de enzimas obtenida de *Trichoderma reesei* en la hidrólisis de rastrojo de maíz pretratado, y WO 2010/080532 estudió el mismo efecto en la hidrólisis de la celulosa microcristalina y rastrojo de maíz pretratado. Dumonceaux et al. (Enzyme and Microbial Technology, (2001) 29: 478-489) investiga el papel de los *Trametes versicolor* CDH1 en el pre-tratamiento de la pulpa de madera. EP1482033 estudió los efectos del tratamiento con células *Coriolus hirsutus*, habiendo suprimido la actividad de deshidrogenasa celobiosa en pulpa mecánica. Subramaniam et al. (Archives de Biochemistry and Biophysics, (1999) 365 (2): 223-230) describe la clonación y caracterización de celobiosa deshidrogenasa de *Sporotrichum thermophile* (también conocido como *Myceliophthora thermophila*). Henriksson et al. (J. Biotech (2000) 78 (2): 93-113) proporciona una revisión de deshidrogenasas de celobiosa. Rosgaard et al. (Biotechnology Progress, (2006), 22 (2): 493-498) describe sistemas de celulasa fúngica para impulsar la degradación enzimática de lignocelulosa de paja de cebada.

Resumen de la invención

[0006] La invención proporciona un proceso de fermentación para la producción de una mezcla de enzimas, comprendiendo el procedimiento el cultivo de una célula fúngica en una fermentación de cultivo líquido sumergido para producir una mezcla de enzimas, en la que la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad deshidrogenasa celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es de la familia Chaetomiaceae, y en la que dicha célula comprende una delección en el gen de deshidrogenasa celobiosa 1 (CDH1), y en el que la célula segrega una mezcla de enzimas que resulta en un rendimiento mejorado de azúcares fermentables en comparación con una célula fúngica correspondiente antes de o sin tal modificación genética. La invención también proporciona una mezcla de enzimas como se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona además un método para la generación de glucosa, comprendiendo el procedimiento: (a) producir una mezcla de enzimas de acuerdo con un proceso de fermentación de la invención; y (b) poner en contacto la celulosa con la mezcla de enzimas producida en la etapa (a).

Resumen de la descripción

[0007] La presente descripción proporciona la mejora de cepas de hongos. En algunas formas de realización, las cepas de hongos mejoradas encuentran uso en la hidrólisis de material celulósico a glucosa.

[0008] La presente descripción proporciona una célula fúngica que se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad de la deshidrogenasa celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es de la familia Chaetomiaceae, en la que dicha célula comprende una delección en los genes de celobiosa deshidrogenasa 1 (CDH1). En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica es *Myceliophthora thermophila*. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido modificada genéticamente para interrumpir el péptido señal de secreción de la celobiosa

deshidrogenasa. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de la deshidrogenasa celobiosa endógena expresada por la célula. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido modificada genéticamente para interrumpir una secuencia de iniciación de la traducción en la transcripción que codifica la celobiosa deshidrogenasa endógena. En algunas realizaciones aún
 5 adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente modificada para introducir una mutación de desplazamiento en la transcripción que codifica la celobiosa deshidrogenasa endógena. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir el nivel de transcripción de un gen que codifica la celobiosa deshidrogenasa endógena. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica ha sido genéticamente
 10 modificada para interrumpir el promotor de un gen que codifica la celobiosa deshidrogenasa endógena. En algunas realizaciones, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para al menos parcialmente suprimir un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la eficiencia catalítica de la celobiosa deshidrogenasa endógena. En algunas formas de realización adicionales, uno o más residuos en un sitio activo de la deshidrogenasa celobiosa en la célula fúngica han sido genéticamente modificados. En algunas formas de realización adicionales, uno o más residuos en
 15 un dominio de unión hemo de la deshidrogenasa celobiosa en la célula fúngica han sido genéticamente modificados.

[0009] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona células fúngicas que comprenden celobiosa deshidrogenasa. En algunas realizaciones, la celobiosa deshidrogenasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 88%, aproximadamente el 90%, aproximadamente
 20 el 93%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, o aproximadamente el 99% idéntica a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica se ha modificado de tal manera que la célula segrega una cantidad reducida de celobiosa deshidrogenasa endógena 1 (CDH1), en comparación con una célula fúngica antes de o sin tal modificación.

[0010] La presente descripción también proporciona una mezcla de enzimas que comprende dos o más enzimas de celulosa hidrolizantes en la que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por la célula fúngica. En algunas formas de realización, la mezcla de enzimas es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones adicionales, la lignocelulosa pretratada comprende al menos un sustrato de la mezcla de enzima. En algunas realizaciones adicionales, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por al menos un
 25 método de tratamiento seleccionado del tratamiento previo con ácido, el tratamiento previo de amoníaco, explosión de vapor, y/o extracción con disolvente orgánico.

[0011] La presente descripción también proporciona métodos para la generación de glucosa que comprende la puesta en contacto de al menos un sustrato de celulosa con una mezcla de enzimas que comprende dos o más
 35 enzimas de celulosa hidrolizantes, en la que al menos uno de las dos o más de enzimas de celulosa hidrolizantes se expresa por una célula fúngica prevista en el presente documento. La presente descripción también proporciona métodos para la generación de glucosa, que comprende la puesta en contacto de al menos un sustrato de celulosa con al menos una mezcla de enzimas proporcionada en este documento. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla de enzimas es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones adicionales, el sustrato de celulosa es
 40 lignocelulosa pretratada. En todavía algunas otras realizaciones, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por al menos un método de tratamiento seleccionado de ácido pretratado, el tratamiento previo de amoníaco, explosión de vapor, y/o extracción con disolvente orgánico. En algunas realizaciones adicionales, los métodos de la presente divulgación comprenden además la fermentación de la glucosa a un producto final. En algunas realizaciones adicionales, el producto final es un alcohol de combustible o un producto químico industrial precursor.
 45 En algunas formas de realización adicionales, el alcohol combustible es etanol o butanol. En todavía algunas realizaciones adicionales, los métodos, las mezclas de enzimas, y/o células fúngicas de la presente descripción proporciona al menos una enzima degradante de celulosa que es homóloga o heteróloga a la célula fúngica.

[0012] La presente descripción también proporciona medios de fermentación que comprende al menos una célula fúngica y/o al menos una mezcla de enzimas como se describe aquí.
 50

Breve descripción de los dibujos

[0013]

La Figura 1 muestra las secuencias acídicas de nucleótidos y aminoácidos de *M. thermophila* CDH1 (SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente).
 55

La Figura 2 proporciona un gráfico que muestra la eficiencia relativa de sacarificación CF-200 y CF-400, medida de la glucosa producida a partir de 100 g/kg de glucano (rastrojo de maíz pre-tratado). Las reacciones se realizaron en
 60 24,6% de sólidos, con 128 mm de NaOAc, a pH 5, 55°C, la enzima 3%, en 110 µl volúmenes. La glucosa se midió usando el ensayo de GOPOD. Las barras de error representan el ± 1 SD, n = 4.

Descripción

[0014] La presente descripción proporciona la mejora de cepas de hongos. En algunas formas de realización, las cepas de hongos mejoradas encuentran uso en la hidrólisis de material celulósico a glucosa. Como se indica en el
 65

presente documento, la presente descripción proporciona cepas de hongos mejoradas para la conversión de celulosa a glucosa. En particular, las mejores cepas de hongos descritas en este documento se modifican genéticamente para reducir la cantidad de actividad celobiosa deshidrogenasa endógena secretada por las células. Antes de la presente invención, se creía generalmente que la celobiosa deshidrogenasa aumenta la velocidad de hidrólisis de la celulosa mediante la reducción de la concentración de celobiosa, que es un potente inhibidor de algunos componentes de celulasa (Véase, por ejemplo, Mansfield et al., Appl. Environ. Microbiol., 63: 3.804-3.809 [1997]; y Igarashi et al, Eur J. Biochem, 253: 101-106 [1998]). Además, celobiosa deshidrogenasa se ha informado que juega un papel crítico en la contribución a mejora sinérgica durante la degradación de celulosa mediante la prevención de la inhibición del producto de hidrólisis (Véase, por ejemplo, Hai et al, J. Appl Glycosci, 49: 9-17 [2002]). También se creía generalmente que la celobiosa deshidrogenasa era útil en deslignificar lignocelulosa, mejorando así la degradación de la celulosa. Recientemente, se ha informado de que deshidrogenasas celobiosas pueden mejorar la actividad de proteínas de mejora celulolíticas de la Familia de Hidrolasa de Glicosil 61 (Véase por ejemplo, WO2010/080532A1), y pueden encontrar uso en las reacciones por motivos de balanza de redox.

[0015] En contra de conocimiento general en la técnica, se dan a conocer las modificaciones genéticas (por ejemplo, supresión) de un gen de codificación de deshidrogenasa celobiosa en células fúngicas productoras de celulasa. Esta modificación resulta en una mejora en el rendimiento de azúcares fermentables a partir de mezclas de enzimas secretadas por las células modificadas genéticamente. Por lo tanto, la reducción de deshidrogenasa celobiosa secretada por un organismo productor de celulasa proporciona una mezcla de enzimas de celulasa que pueden mejorar el rendimiento de azúcares fermentables durante la hidrólisis enzimática de sustratos que contienen celulosa. Además, la delección del gen *cdh* proporciona espacio adicional en el genoma de la célula fúngica para la introducción de otras secuencias (por ejemplo, secuencias que codifican las proteínas heterólogas de interés).

[0016] En consecuencia, se describe aquí una célula fúngica que se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de deshidrogenasa celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es de la familia Chaetomiaceae, y en la que la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla de enzimas que contiene celulosa. En algunas realizaciones, la célula fúngica es capaz de secretar una mezcla de enzimas que comprende dos o más enzimas de celulasa. En algunas realizaciones, la célula fúngica es un miembro de la familia Chaetomiaceae del género *Achaetomium*, *Aporothielavia*, *Chaetomidium*, *Chaetomium*, *Corylomyces*, *Corynascus*, *Farrowia*, *Thielavia*, *Zopfiella*, o *Myceliophthora*. En algunas realizaciones, la célula fúngica modificada genéticamente proporcionada en este documento es un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de los géneros *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus*, o *Chaetomium*.

[0017] Se reconoce que la taxonomía fúngica sigue experimentando una reorganización. Por lo tanto, se pretende que todos los aspectos de la presente invención abarcan géneros y especies que han sido reclasificados, incluyendo pero no limitado a organismos tales como *Myceliophthora thermophila*, que también ha recibido otros nombres (por ejemplo, *Sporotrichum thermophile*, *Sporotrichum thermophilum*, *Thelavia heterothallica*, *Corynascus heterothallica*, *Chrysosporium thermophilum* y *Myceliophthora indica*). De hecho, se pretende que la presente invención abarque todos los teleomorfos, anamorfos, y sinónimos, basónimos, o equivalentes taxonómicos de los mismos.

[0018] En algunas realizaciones, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad de la deshidrogenasa endógena celobiosa que es secretada por la célula. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, o *Thermoascus*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia terrestris*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia heterothallica*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces stipitatus*, o *Myceliophthora thermophila*. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una célula fúngica aislada.

[0019] En algunas realizaciones, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido modificada genéticamente para interrumpir el péptido señal de secreción de deshidrogenasa celobiosa. En algunas realizaciones, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de la deshidrogenasa celobiosa endógena expresada por la célula. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula fúngica modificada genéticamente para interrumpir una secuencia de iniciación de la traducción, mientras que en algunas otras realizaciones, la célula fúngica es modificada genéticamente para introducir una mutación de desplazamiento de marco en la transcripción que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. En algunas otras realizaciones, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir el nivel de transcripción de un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula fúngica es modificada genéticamente para alterar el promotor de un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula fúngica es modificada genéticamente para alterar el gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena a través de uso de codones de parada, la eliminación terminadora, transposones, etc. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para al menos eliminar parcialmente un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. En algunas otras realizaciones, la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la eficiencia catalítica de la deshidrogenasa celobiosa endógena. En algunas realizaciones, la célula fúngica ha sido modificada genéticamente, de tal manera que uno o más residuos en un sitio activo de la deshidrogenasa celobiosa han sido mutado. En

algunas realizaciones, uno o más residuos en un dominio de unión heme de la deshidrogenasa celobiosa de la célula fúngica han sido genéticamente modificada. De hecho, se pretende que cualquier medio adecuado para la modificación de la célula fúngica para reducir la cantidad de deshidrogenasa celobiosa expresada y/o secretada por la célula encontrarán uso en la presente invención.

[0020] En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa se engloba dentro de CE 1.1.99.18. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 85%, aproximadamente el 86%, aproximadamente el 87%, aproximadamente el 88%, aproximadamente el 89%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o aproximadamente el 100% idéntica a SEQ ID NO: 2.

[0021] En algunas realizaciones, la célula fúngica comprende además al menos un gen que codifica al menos una enzima degradante de celulosa que es heteróloga a la célula fúngica. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula fúngica sobreexpresa un gen homólogo o heterólogo que codifica una enzima degradante de celulosa tal como beta-glucosidasa. En algunas formas de realización, la célula fúngica sobreexpresa beta-glucosidasa y ha sido genéticamente modificado para reducir la cantidad de actividad deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula.

[0022] La presente descripción también proporciona mezclas de enzimas que comprenden dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos uno de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por una célula de hongo como se describe aquí. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula fúngica es una célula que ha sido modificada genéticamente para reducir la cantidad de actividad de la deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula, en la que la célula fúngica es un miembro del género *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, o *Thermoascus*. En algunas formas de realización, la mezcla de enzimas es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones adicionales, un sustrato de la mezcla de enzima comprende lignocelulosa pretratada. En algunas realizaciones, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por tratamiento previo con ácido, el tratamiento previo de amoníaco, explosión de vapor, y/o extracción con disolvente orgánico. En algunas formas de realización, la mezcla de enzimas comprende adicionalmente al menos una enzima degradante de celulosa que es heteróloga a la célula fúngica. En algunas realizaciones, al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por una célula de hongo aislada.

[0023] La presente descripción también proporciona métodos para la generación de glucosa que comprenden la puesta en contacto de la celulosa con una mezcla de al menos dos enzimas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos comprenden la puesta en contacto de la celulosa con una mezcla de enzimas que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa que se expresan por una célula fúngica tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos comprenden la puesta en contacto de la celulosa con una mezcla de enzimas que comprende dos o más de enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por una célula que ha sido modificada genéticamente para reducir la cantidad de actividad deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula, en la que la célula fúngica es *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Sporotrichum*, *Corynascus*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, o *Thermoascus*. En algunas realizaciones, los métodos dan como resultado un aumento del rendimiento de la glucosa y/o celobiosa de la celulosa hidrolizada y la disminución de la oxidación de la celobiosa a productos de azúcar oxidados, tales como gluconolactona, gluconato, ácido glucónico, celobionolactona, y/o ácido celobiónico de la celulosa hidrolizada.

[0024] En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla de enzimas es una mezcla libre de células. En algunas realizaciones adicionales, el sustrato de celulosa comprende lignocelulosa pretratada. En algunas realizaciones adicionales, la lignocelulosa pretratada comprende lignocelulosa tratada por al menos un método de tratamiento, tales como tratamiento previo con ácido, el tratamiento previo de amoníaco, explosión de vapor y/o extracción con disolvente orgánico.

[0025] En algunas realizaciones de la descripción, los métodos comprenden además la fermentación de la glucosa a un producto final tal como un alcohol de combustible o un producto químico industrial precursor. En algunas realizaciones, el alcohol de combustible es etanol o butanol. En algunas realizaciones, los métodos comprenden la puesta en contacto de la celulosa con una mezcla de enzimas que comprende además una enzima de degradación de la celulosa que es heteróloga a la célula fúngica.

[0026] También se describe en la presente medios de fermentación que comprende la célula fúngica de cualquiera de las realizaciones anteriores, y/o comprendiendo la mezcla de enzima derivada de la célula fúngica de cualquiera de las realizaciones anteriores.

Definiciones

[0027] A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención implica técnicas convencionales usadas comúnmente en biología molecular, ingeniería de proteínas, y microbiología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas son bien conocidas y se describen en numerosos textos y trabajos de referencia conocidos por los expertos en la técnica.

[0028] Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Muchos diccionarios técnicos son conocidos por los expertos en la técnica. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria encuentran uso en la práctica de la presente invención adecuada, algunos métodos y materiales preferidos se describen en este documento. Se ha de entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos, ya que estos pueden variar, dependiendo del contexto en el que son utilizados por los expertos en la técnica. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se describen con más detalle por referencia a la aplicación como un todo.

[0029] También, como se usa en este documento, el singular "un", "una" y "el" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el rango. Por lo tanto, cada intervalo numérico descrito en este documento se pretende que abarque todos los intervalos numéricos más limitados que esté dentro de dicho intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos más pequeños fueron escritos todos expresamente en este documento. También se pretende que cada limitación numérica máxima (o mínima) descrita en este documento incluye cada limitación numérica inferior (o superior), como si tales limitaciones numéricas inferiores (o superiores) fueran escritas expresamente en este documento. Además, los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que pueden ser por referencia a la aplicación como un todo. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación están más completamente definidos por referencia a la aplicación como un todo. Sin embargo, con el fin de facilitar la comprensión de la invención, un número de términos se definen a continuación. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente.

[0030] Tal como se utiliza aquí, el término "comprende" y sus afines se utiliza en su sentido inclusivo (es decir, equivalente al término "incluyendo" y sus correspondientes cognados).

[0031] En la presente memoria, "sustrato" se refiere a una sustancia o compuesto que se convierte o se destina a ser convertido en otro compuesto por la acción de una enzima. El término incluye no sólo un único compuesto, sino también combinaciones de compuestos, tales como soluciones, mezclas y otros materiales que contienen al menos un sustrato.

[0032] Como se usa en el presente documento, "conversión" se refiere a la transformación enzimática de un sustrato en el producto correspondiente. "Porcentaje de conversión" se refiere al porcentaje del sustrato que se convierte en el producto dentro de un período de tiempo en condiciones especificadas. Así, por ejemplo, la "actividad enzimática" o "actividad" de un polipéptido de deshidrogenasa celobiosa ("CDH" o "cdh") pueden expresarse como "porcentaje de conversión" del sustrato al producto.

[0033] Como se usa aquí, "actividad secretada" se refiere a la actividad enzimática de enzimas oxidantes celobiosas producidas por una célula de hongo que está presente en un entorno extracelular. Un entorno extracelular puede ser, por ejemplo, un medio extracelular, tal como un medio de cultivo. La actividad secretada está influenciada por la cantidad total de enzima oxidante celobiosa secretada, y también está influenciada por la eficiencia catalítica de la enzima oxidante celobiosa secretada.

[0034] Tal como se utiliza aquí, una "reducción de la eficiencia catalítica" se refiere a una reducción en la actividad de la enzima oxidante celobiosa, en relación con la enzima oxidante celobiosa sin modificar, según se mide usando técnicas estándar, según lo previsto en el presente documento o de otra manera conocida en la técnica.

[0035] Tal como se utiliza aquí, el término "mezcla de enzima" se refiere a una combinación de al menos dos enzimas. En algunas realizaciones, al menos dos enzimas están presentes en una composición. En algunas realizaciones adicionales, las mezclas de enzimas están presentes dentro de una célula (por ejemplo, una célula de hongo). En algunas realizaciones, cada una o algunas de las enzimas presentes en una mezcla de enzimas son producidas por diferentes células fúngicas y/o diferentes cultivos de hongos. En algunas formas de realización adicionales, todas las enzimas presentes en una mezcla de enzimas son producidas por la misma célula. En algunas realizaciones, las mezclas de enzimas comprenden enzimas de celulasa, mientras que en algunas formas de realización adicionales, las mezclas de enzimas comprenden enzimas distintas de las celulasas. En algunas realizaciones, las mezclas de enzimas comprenden al menos una celulasa y al menos una enzima distinta de una celulasa. En algunas realizaciones, las mezclas de enzimas comprenden enzimas incluyendo, pero no limitado a endoxilanasas (CE 3.2.1.8), beta-xilosidasas (CE 3.2.1.37), alfa-L-arabinofuranosidasas (CE 3.2.1.55), alfa-glucuronidasas (CE 3.2.1.139), acetilxilanesterasas (CE 3.1.1.72), esterazas de feruloil (CE 3.1.1.73), esterazas de

coumaroil (CE 3.1.1.73), alfa-galactosidasas (CE 3.2.1.22), beta-galactosidasas (CE 3.2.1.23), beta-mananasas (CE 3.2.1.78), beta-manosidasas (CE 3.2.1.25), endo-poligalacturonasas (CE 3.2.1.15), esterases de metilo de pectina (CE 3.1.1.11), endo-galactanasas (CE 3.2.1.89), esterases de pectina de acetilo (CE 3.1.1.6), endo-liasas de pectina (CE 4.2.2.10), liasas de pectato (CE 4.2.2.2), ramnosidasas alfa (CE 3.2.1.40), exo-galacturonasas (CE 3.2.1.82), exo-galacturonasas (CE 3.2.1.67), liasas de exopoligalacturonato (CE 4.2.2.9), endoliasas de ramnogalacturonano (CE 4.2.2.B3), acetilesterasas de ramnogalacturonano (CE 3.2.1.B11), galacturonohidrolasas de ramnogalacturonano (CE 3.2.1.B11), endo-arabinanasas (CE 3.2.1.99), lacasas (CE 1.10.3.2), peroxidasa dependiente de manganeso (CE 1.10.3.2), amilasas (CE 3.2.1.1), glucoamilasas (CE 3.2.1.3), lipasas, peroxidasas de lignina (CE 1.11.1.14), y/o proteasas.

[0036] En algunas realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona además mezclas de enzimas que comprenden al menos una expansina y/o proteína similar a expansina, tal como una swolenina (Véase, por ejemplo, Salheimo et al, Eur J. Biochem, 269: 4202-4211 [2002]) y/o una proteína similar a swolenina. Las expansinas están implicadas en el aflojamiento de la estructura de la pared celular durante el crecimiento celular de la planta. Se han propuesto expansinas para interrumpir el enlace de hidrógeno entre la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De esta manera, se cree que permitir el deslizamiento de fibras de celulosa y la ampliación de la pared celular. Swolenina, una proteína similar a expansina contiene un dominio de familia Módulo 1 N-terminal de hidratos de carbono de unión (CDB) y un dominio similar a expansina C-terminal. En algunas realizaciones, una proteína similar a expansina y/o proteína similar a swolenina comprende uno o ambos de dichos dominios y/o interrumpe la estructura de las paredes celulares (por ejemplo, interrupción de estructura de celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores. En algunas realizaciones adicionales, las mezclas de enzimas comprenden al menos un producto de polipéptido de una celulosa integración de proteínas, scaffoldina y/o una proteína de scaffoldina similar (por ejemplo, CIPA o CIPC de *Clostridium thermocellum* o *Clostridium cellololyticum*, respectivamente). En algunas realizaciones adicionales, las mezclas de enzimas comprenden al menos una proteína inducida por celulosa y/o proteína de la modulación (por ejemplo, codificada por gen cip1 o cip2 y/o genes similares de *Trichoderma reesei*, véase, por ejemplo, Foreman et al, J. Biol. Chem., 278: 31.988 a 31.997 [2003]). En algunas realizaciones adicionales, las mezclas de enzimas comprenden al menos un miembro de cada una de las clases de los polipéptidos descritos anteriormente, varios miembros de una clase de polipéptido, o cualquier combinación de estas clases de polipéptidos para proporcionar mezclas de enzimas adecuadas para diversos usos. Cualquier combinación de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más de cinco enzimas y/o polipéptidos encuentran uso en diversas mezclas de enzimas proporcionadas en la presente. De hecho, no se pretende que las mezclas de enzimas de la presente invención se limiten a ninguna enzima en particular, polipéptidos, ni combinaciones, en la medida que cualquier mezcla de enzimas adecuada encuentra uso en la presente invención.

[0037] Tal como se utiliza aquí, el término "sacárido" se refiere a cualquier hidrato de carbono que comprende monosacáridos (por ejemplo, glucosa, ribosa, fructosa, galactosa, etc.), disacáridos (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, la melibiosa, etc.), oligosacáridos (por ejemplo, la rafinosa, estaquiosa, amilosa, etc.), y polisacáridos (por ejemplo, almidón, glucógeno, celulosa, quitina, xilano, arabinoxilano, manano, fucoidan, galactomanano, calosa, laminarina, crisolaminarina, amilopectina, dextrano, dextrinas, maltodextrinas, inulina, oligofructosa, polidextrosa, etc.). El término abarca hidratos de carbono simples, así como hidratos de carbono complejos. De hecho, no se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier sacárido particular, tal como diversos sacáridos y formas de sacáridos encuentran uso en la presente invención.

[0038] Tal como se utiliza aquí, el término "enzima hidrolizante de sacárido" se refiere a cualquier enzima que hidroliza al menos un sacárido.

[0039] Tal como se usa en el presente documento, los términos "enzima oxidante celobiosa" se refiere a las enzimas que oxidan celobiosa. En algunas realizaciones, las enzimas oxidantes de deshidrogenasa celobiosa incluyen celobiosa (CE 1.1.99.18).

[0040] Tal como se usa en el presente documento, los términos "deshidrogenasa celobiosa", "CDH," y "cdh" se refieren a una celobiosa: aceptor 1- oxidorreductasa que cataliza la conversión de celobiosa en presencia de un aceptor de cellobiono-1,5-lactona y un aceptor reducido. Ejemplos de deshidrogenasas celobiosas caen en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.99.18). Típicamente 2,6-dicloroindofenol puede actuar como aceptor, al igual que el hierro, especialmente Fe(SCN)₃, oxígeno molecular, ubiquinona, o citocromo C, y otros polifenoles, tales como la lignina. Los sustratos de la enzima incluyen celobiosa, celooligosacáridos, lactosa y D-glucosil-1,4-β-D-manosa, glucosa, maltosa, manobiosa, tiocelobiosa, galactosilo-manosa, xilobiosa, xilosa. donadores de electrones incluyen beta-1-4 dihexosos con glucosa o manosa en el extremo reductor, aunque alfa 1-4 hexósidos, hexosas, pentosas, y pentómeros beta-1-4 pueden actuar como sustratos para al menos algunas de estas enzimas (Véase por ejemplo, Henriksson et al, Biochim. Biophys. Acta-Prot. Struct. Mol. Enzymol., 1383: 48-54 [1998]; y Schou et al, Biochem J., 330: 565-571 [1998]). En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa de interés en la presente invención es CDH1, que está codificada por el gen CDH1.

[0041] Tal como se usa en el presente documento, los términos "de oxidación", "oxidiza(do)" y similares, como se utilizan aquí, se refieren a la formación enzimática de uno o más productos de oxidación de celobiosa. Cuando se

utiliza en referencia a un porcentaje de celobiosa oxidada, estos porcentajes reflejan un porcentaje en peso (w/w) con respecto a la cantidad inicial de sustrato. Por ejemplo, cuando se pone en contacto la mezcla de enzimas con celobiosa, el porcentaje de celobiosa oxidado refleja un porcentaje en peso (w/w) con respecto a la cantidad inicial de celobiosa presente en solución. Cuando la mezcla de enzima se pone en contacto con un sustrato de celulosa, el porcentaje de celobiosa oxidado refleja un porcentaje en peso (w/w), basado en la cantidad máxima (% en peso) de glucosa que podría producirse a partir de la celulosa hidrolizada total (es decir, G_{max}).

[0042] Tal como se usa en este documento, "celulosa" se refiere a un polímero de la glucosa de azúcar simple vinculada por enlaces beta-1,4 glucosídicos.

[0043] Como se usa en este documento, "celobiosa" se refiere a un dímero unido-beta-1,4-soluble en agua de la glucosa.

[0044] Tal como se utiliza aquí, el término "celodextrina" se refiere a un polímero de glucosa de longitud variable (es decir, que comprende al menos dos monómeros de glucosa). Cada monómero de glucosa está vinculado a través de un enlace glucosídico beta-1,4. A celodextrina se clasifica por su grado de polimerización (DP), que indica el número de monómeros de glucosa que contiene la celodextrina. Las celodextrinas más comunes son: celobiosa (DP = 2); celotriosa (DP = 3); celotetrosa (DP = 4); celopentosa (DP = 5); y celohexosa (DP = 6). En algunas realizaciones, celodextrinas tienen un DP de 2 a 6 (es decir, celobiosa, celotriosa, celotetrosa, celopentosa, y/o celohexosa). En algunas realizaciones, celodextrinas tienen un DP mayor que 6. El grado de polimerización de las moléculas de celodextrina puede ser medida (por ejemplo, por espectrometría de masas, incluyendo, pero no limitado a, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI), y espectrometría de masas de trampa de iones por ionización electrospray (ESI-IT)). Los métodos para medir el grado de polimerización de las moléculas de celodextrina son conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Melander et al, *Biomacromol*, 7: 1410-1421 [2006]).

[0045] Tal como se utiliza aquí, el término "celulasa" se refiere a cualquier enzima que es capaz de degradar la celulosa. Por lo tanto, el término abarca enzimas capaces de hidrolizar celulosa (enlaces de beta-1,4-glucano o β -D-glucosídico) a cadenas más cortas de celulosa, oligosacáridos, celobiosa y/o glucosa. "Las celulasas" están divididas en tres sub-categorías de enzimas: glucanohidrolasa de 1,4- β -D-glucano ("endoglucanasa" o "EG"); celobiohidrolasa de 1,4- β -D-glucano ("exoglucanasa", "celobiohidrolasa," o "CBH"); y β -D-glucósido-glucosidasa (" β -glucosidasa", "celobiasa", "BG", o "BGL"). Estas enzimas actúan en concierto para catalizar la hidrólisis de sustratos que contienen celulosa. Las endoglucanasas rompen los enlaces internos e interrumpen la estructura cristalina de la celulosa, exponiendo cadenas de polisacáridos de celulosa individuales ("glucanos"). Celobiohidrolasas incrementalmente acortan las moléculas de glucano, liberando principalmente unidades de celobiosa (un dímero de glucosa enlazado a β -1,4 soluble en agua), así como glucosa, celotriosa, y celotetrosa. Las beta-glucosidasas dividen la celobiosa en monómeros. Las celulasas a menudo comprenden una mezcla de diferentes tipos de enzimas celulolíticas (endoglucanasas y celobiohidrolasas) que actúan de forma sinérgica para descomponer la celulosa a di- u oligosacáridos solubles tales como celobiosa, que después se hidroliza adicionalmente a la glucosa por la beta-glucosidasa. Las enzimas celulasas son producidas por una amplia variedad de microorganismos. Las celulasas (y hemicelulasas) de hongos filamentosos y algunas bacterias son ampliamente explotadas para muchas aplicaciones industriales que implican el procesamiento de fibras naturales a azúcares.

[0046] Tal como se utiliza aquí, una "célula fúngica productora de celulasa" es una célula fúngica que produce al menos una enzima de celulasa (es decir, "enzima hidrolizante de celulosa"). En algunas realizaciones, las células fúngicas productoras de celulasa descritas en este documento expresan y secretan una mezcla de enzimas de celulosa hidrolizantes.

[0047] Tal como se usa en el presente documento, los términos "enzima hidrolizante de celulosa", "enzima celulolítica," y términos similares se refieren a una enzima que actúa en el proceso de descomposición de la celulosa en di- u oligosacáridos solubles tales como celobiosa, que están después hidrolizados a glucosa por la beta-glucosidasa. También se conoce una mezcla de enzimas que hidrolizan la celulosa en el presente documento como "celulasas," una "mezcla que contiene celulasa" y/o "una mezcla de celulasa."

[0048] Tal como se usa en el presente documento, los términos "endoglucanasa" y "EG" se refieren a una categoría de celulasas (CE 3.2.1.4) que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos internos de celulosa β -1,4. El término "endoglucanasa" se define además en este documento como una endo-1,4 (1,3; 1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (CE 3.2.1.4), que cataliza endohidrolisis de enlaces glicosídicos 1,4-beta-D en celulosa, derivados de celulosa (tales como celulosa de carboximetilcelulosa y celulosa de hidroxietil), liquenano, enlaces beta-1,4 en glucanos mixtos beta-1,3, tales como beta-D-glucanos o xiloglucanos cereales, y otros componentes celulósicos que contiene material vegetal. La actividad de endoglucanasa puede determinarse sobre la base de una reducción en la viscosidad del sustrato o el aumento en la reducción de extremos determinados por una reducción de ensayo de azúcar (véase, por ejemplo, Zhang et al, *Biotechnol Adv*, 24: 452-481 [2006]). Para los fines de la presente invención, la actividad endoglucanasa es determinada utilizando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) (Véase, por ejemplo, Ghose, *Pur Appl Chem*, 59: 257-268 [1987]).

[0049] Como se usa en este documento, "EG1" se refiere a una enzima activa de carbohidratos expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una glicohidrolasa (GH) del dominio catalítico de familia 7 clasificado con CE 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo de la misma. En algunas realizaciones, el EG1 está unido funcionalmente a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de Familia 1.

[0050] Tal como se utiliza aquí, el término "EG2" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una glicohidrolasa (GH) de la familia de 5 dominio catalítico clasificadas en CE 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo en esto. En algunas realizaciones, el EG2 está unido funcionalmente a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa 1 Familia.

[0051] Tal como se utiliza aquí, el término "EG3" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio catalítico de glicohidrolasa (GH) de la familia 12 clasificado en CE 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo del mismo. En algunas realizaciones, la EG3 está unida funcionalmente a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de Familia 1.

[0052] Tal como se utiliza aquí, el término "EG4" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una glicohidrolasa (GH) del dominio catalítico de familia 61 clasificado con CE 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, la EG4 está unida funcionalmente a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de Familia 1.

[0053] Tal como se utiliza aquí, el término "EG5" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una glicohidrolasa (GH) del dominio catalítico de familia 45 clasificado con CE 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, la EG5 está unida funcionalmente a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de Familia 1.

[0054] Tal como se utiliza aquí, el término "EG6" se refiere a una enzima activa de hidrato de carbono expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para una (GH) del dominio catalítico de glicohidrolasa de familia 6 clasificado en CE 3.2.1.4 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la EG6 está unida funcionalmente a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de Familia 1.

[0055] Tal como se usa en el presente documento, los términos "celobiohidrolasa" y "CBH" se refieren a una categoría de celulasas (CE 3.2.1.91) que hidrolizan enlaces glucosídicos en celulosa. El término "celobiohidrolasa" se define además en el presente documento como una celobiohidrolasa 1,4-beta-D-glucano (CE 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, celooligosacáridos, o cualquier glucosa enlazada a beta-1,4 que contiene polímero, liberando celobiosa de las extremidades reductoras o no reductoras de la cadena (véase, por ejemplo, Teeri, *Tr Biotechnol.*, 15: 160-167 [1997]; y Teeri et al., *Biochem Soc Trans*, 26: 173-178 [1998]). En algunas realizaciones, la actividad de celobiohidrolasa se determina usando un disacárido derivado fluorescente 4-metilumbeliferil-beta-D-lactósido (véase, por ejemplo, van Tilbeurgh et al, *FEBS Lett*, 149: 152-156 [1982]; y van Tilbeurgh . y Claeysens, *FEBS Lett*, 187: 283-288 [1985]).

[0056] Tal como se usa en el presente documento, los términos "CBH1" y "celobiohidrolasa de tipo 1" se refieren a una enzima activa de carbohidratos expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio catalítico de glicohidrolasa (GH) de Familia 7 clasificado bajo CE 3.2.1.91 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo del mismo. En algunas realizaciones, la CBH1 está funcionalmente ligada a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de Familia 1.

[0057] Tal como se usa en el presente documento, los términos "CBH2" y "celobiohidrolasa de tipo 2" se refieren a una enzima activa de carbohidratos expresada a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio catalítico de glicohidrolasa (GH) de Familia 6 clasificado bajo CE 3.2.1.91 o cualquier proteína, polipéptido o fragmento catalíticamente activo de la misma. Celobiohidrolasas de tipo 2 también se conocen comúnmente como "la familia Cel6." En algunas realizaciones, la CBH2 está unida funcionalmente a un módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a celulosa de Familia 1.

[0058] Tal como se usa en el presente documento, los términos "beta-glucosidasa", "celobiasa," y "BGL" se refiere a una categoría de celulasas (CE 3.2.1.21) que catalizan la hidrólisis de celobiosa en glucosa. El término "beta-glucosidasa" se define además en el presente documento como una glucohidrolasa de beta-D-glucósido (CE 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos de glucosa beta-D terminales no reductores con la liberación de beta-D-glucosa. La actividad de beta-glucosidasa se puede determinar usando cualquier método adecuado (véase por ejemplo, *J. básica Microbiol.*, 42: 55-66 [2002]). Una unidad de actividad de beta-glucosidasa se define como 1,0 pmol de p-nitrofenol producido por minuto a 40°C, pH 5 a partir de 1 mM de p-nitrofenilo-beta-D-glucopiranosido

como sustrato en citrato de sodio 100 mM que contiene 0,01% de TWEEN® 20.

[0059] Tal como se utiliza aquí, el término "hidrolasa glicósida 61" y "GH61" se refiere a una categoría de celulasas que mejoran la hidrólisis de la celulosa cuando se usa en conjunción con una o más celulasas. La familia GH61 de celulasas se describe, por ejemplo, en la base de datos de enzimas activas de hidratos de carbono (CAZY) (Véase, por ejemplo, Harris et al, *Biochem*, 49 (15): 3305-16 [2010]).

[0060] Una "hemicelulasa" tal como se utiliza aquí, se refiere a un polipéptido que puede catalizar la hidrólisis de la hemicelulosa en pequeños polisacáridos tales como oligosacáridos, o sacáridos monoméricos. Hemiceluloses incluyen xilano, glucuronóxilano, arabinóxilano, glucomanano y xiloglucano. Las hemicelulasas incluyen, por ejemplo, las siguientes: endoxilanasas, beta-xilosidasas, alfa-L-arabinofuranosidasas, alfa-D-glucuronidasas, esterases de feruloil, esterases de coumaroil, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, beta-mananasas, y beta-manosidasas.

[0061] Tal como se usa en el presente documento, los términos "actividad de degradación de xilano" y "actividad xilanolítica" se definen aquí como una actividad biológica que hidroliza el material que contiene xilano. Los dos enfoques básicos para medir la actividad xilanolítica incluyen: (1) la medición de la actividad xilanolítica total y (2) la medición de las actividades xilanolíticas individuales (endoxilanasas, xilosidasas beta, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, esterases acetilxilanas, esterases de feruloil, y esterases de alfaglucuronilo) (Véase, por ejemplo, Biely y Puchard, *J. Sci Food Agr* 86: 1636-1647 [2006]; Spánikova y Biely, *FEBS Lett*, 580: 4597 a 4601 [2006]; y Herrmann et al., *Biochem J.*, 321: 375-381 [1997]).

[0062] La actividad total de degradación de xilano se puede medir mediante la determinación de los azúcares reductores formados a partir de varios tipos de xilano de avena espelta, incluyendo, madera de haya, y xilanos de alerce, o por determinación fotométrica de fragmentos de xilano teñido liberados por diversos xilanos covalentemente teñidos. Un ensayo de actividad xilanolítica total común se basa en la producción de azúcares reductores de glucuronoxilano polimérico 4-O-metilo (véase, por ejemplo, Bailey et al, *J.Biotechnol.*, 23: 257-270 [1992]). En algunas realizaciones, la actividad degradante de xilano se determina midiendo el aumento de la hidrólisis de madera de abedul xilano (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, Mo., EE.UU.) mediante enzima de xilano de degradación bajo las siguientes condiciones típicas: 1 mL reacciones, 5 mg/ml de sustrato (sólidos totales), 5 mg de proteína xilanolítica/g de sustrato, 50 mM de acetato sódico de pH 5, 50°C, 24 horas, el análisis de azúcar usando ensayo de hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) (Véase, por ejemplo, Palanca, *Anal Biochem.*, 47: 273-279 [1972]).

[0063] Tal como se utiliza aquí, el término "actividad de xilanasa" se refiere a una actividad de 1,4-beta-D-xilano xilohidrolasa (CE 3.2.1.8) que cataliza la endo-hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos. En algunas realizaciones, la actividad xilanasa se determina usando xilano de madera de abedul como sustrato. Una unidad de actividad de xilanasa se define como 1,0 mmol de azúcar reductor (medida en equivalentes de glucosa; véase por ejemplo, Lever, *Anal Biochem*, 47: 273-279 [1972]) producido por minuto durante el período inicial de la hidrólisis a 50°C, pH 5 a partir de 2 g de xilano de madera de abedul por litro como sustrato en acetato de sodio 50 mM que contiene 0,01% de TWEEN® 20.

[0064] Tal como se utiliza aquí, el término "actividad de beta-xilosidasa" se refiere a un xilohidrolasa beta-D-xilósido (CE 3.2.1.37) que cataliza la exo-hidrólisis de beta corta (1 → 4)-xilooligosacáridos, para eliminar sucesivos residuos de D-xilosa de los extremos no reductores. En algunas realizaciones de la presente invención, una unidad de actividad de beta-xilosidasa se define como 1,0 μmol de p-nitrofenol producido por minuto a 40°C, pH 5 a partir de 1 mM de p-nitrofenilo-beta-D-xilósido como sustrato en 100 citrato de sodio mM que contiene 0,01% de TWEEN® 20.

[0065] Tal como se utiliza aquí, el término "actividad de esterasa de acetilxilano" se refiere a una actividad carboxilesterasa (CE 3.1.1.72) que cataliza la hidrólisis de grupos de acetilo a partir de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de alfa-naftilo, y acetato de p-nitrofenilo. En algunas realizaciones de la presente invención, la actividad de esterasa acetilxilana se determina utilizando 0,5 mM p-nitrofenilacetato como sustrato en 50 mM de acetato de sodio pH 5,0 que contiene 0,01% de TWEEN® 20. Una unidad de actividad de esterasa acetilxilana se define como la cantidad de enzima capaz de la liberación de 1 pmol de anión p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0066] Tal como se utiliza aquí, el término "actividad de esterasa feruloil" se refiere a una actividad de hidrolasa de 4-hidroxi-3-metoxicinamoil-azúcar (CE 3.1.1.73) que cataliza la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoil (feruloil) de un azúcar esterificado, que suele ser de arabinosa en sustratos "naturales", para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato). Esterasa de feruloil también se conoce como esterasa de ácido ferúlico, esterasa hidroxicinamoil, FAE-III, hidrolasa de éster cinamoilo, FAEA, cinnAE, FAE-I, o FAE-II. En algunas realizaciones de la presente invención, la actividad de esterasa feruloil se determina utilizando 0,5 mM p-nitrofenilferulato como sustrato en 50 mM de acetato de sodio pH 5,0. Una unidad de actividad de esterasa de feruloil es igual a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 mmol de anión p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0067] Tal como se utiliza aquí, el término "actividad alfa-glucuronidasa" se refiere a una actividad de glucuronohidrolasa de D-alfa-glucosiduronato (CE 3.2.1.139) que cataliza la hidrólisis de una alfa-D-glucuronósido a

D-glucuronato y un alcohol. Una unidad de actividad alfa-glucuronidasa es igual a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 pmol de glucurónico o ácido 4-O-metilglucurónico por minuto a pH 5, 40°C (véase, por ejemplo, de Vries, J. Bacteriol, 180: 243-249 [1998]).

5 **[0068]** Tal como se utiliza aquí, el término "actividad alfa-L-arabinofuranosidasa" se refiere a una actividad de arabinofuranohidrolasa-alfa-L-arabinofuranósido (CE 3.2.1.55) que cataliza la hidrólisis de residuos alfa-L-arabinofuranósidos no reductores terminales en alfa-L-arabinósidos. La actividad de la enzima actúa sobre alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contienen (1,3)-y/o (1,5)-enlaces, arabinoxilanos, y arabinogalactanos. Alfa-L-arabinofuranosidasa también se conoce como arabinosidasa, alfa-arabinosidasa, alfa-L-arabinosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, arabinofuranosidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa de polisacárido, hidrolasa de alfa-L-arabinofuranósido, L-arabinosidasa y alfa-L-arabinanasa. Para los fines de la presente invención, la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa se determina utilizando 5 mg de arabinoxilano de trigo de viscosidad media (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Ireland) por ml de 100 mM de acetato sódico pH 5 en un volumen total de 200 µl durante 30 minutos a 40°C, seguido por análisis de arabinosa AMINEX®. Cromatografía de columna HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Calif., EE.UU.).

10 **[0069]** Despolimerización de lignina enzimática se puede lograr mediante peroxidasa de lignina, peroxidasa de manganeso, lacasas y deshidrogenasas de celobiosa (CDH), trabajando a menudo en sinergia. Estas enzimas extracelulares, esenciales para la degradación de la lignina, a menudo se denominan "enzimas de lignina modificadoras" o "LME." Tres de estas enzimas comprenden dos peroxidasa glicosiladas que contienen hemo: peroxidasa de lignina (LIP); peroxidasa dependiente de Mn (MNP); y, un cobre que contiene lacasa de fenoloxidasa (LCC). Aunque los detalles del esquema de reacción de la biodegradación de la lignina no se entienden completamente hasta la fecha, sin pretender imponer ninguna teoría, se sugiere que estas enzimas empleen radicales libres para reacciones de despolimerización.

20 **[0070]** Tal como se utiliza aquí, el término "lacasa" se refiere al cobre que contiene enzimas de oxidasa que se encuentran en muchas plantas, hongos y microorganismos. Las lacasas son enzimáticamente activas en fenoles y moléculas similares y realizan una oxidación de un electrón. Las lacasas pueden ser poliméricas y la forma enzimáticamente activa puede ser un dímero o trímero.

30 **[0071]** Tal como se utiliza aquí, el término "peroxidasa dependiente de Mn" se refiere a las peroxidasa que requieren Mn. La actividad enzimática de la peroxidasa dependiente de Mn (MNP) depende de Mn²⁺. Sin estar ligado por la teoría, se ha sugerido que la función principal de esta enzima es la oxidación de Mn²⁺ a Mn³⁺ (véase, por ejemplo, Glenn et al Arco Biochem Biophys, 251: 688-696 [1986]). Posteriormente, los sustratos fenólicos son oxidados por el Mn³⁺ generado.

35 **[0072]** Tal como se utiliza aquí, el término "peroxidasa de lignina" se refiere a un grupo hemo extracelular que cataliza la depolimerización oxidativa de soluciones diluidas de lignina polimérica *in vitro*. Algunos de los sustratos de LIP, en particular alcohol de 3,4-dimetoxibencilo (alcohol veratrílico, VA), son compuestos redox activos que se han demostrado actuar como mediadores redox. VA es un metabolito secundario producido al mismo tiempo que el labio por culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium* y sin pretender imponer ninguna teoría, se ha propuesto para funcionar como un mediador redox fisiológica en la oxidación catalizada de labios de la lignina *in vivo* (Véase, por ejemplo., Harvey et al, FEBS Lett 195: 242-246 [1986]).

45 **[0073]** Tal como se utiliza aquí, el término "glucoamilasa" (CE 3.2.1.3) se refiere a las enzimas que catalizan la liberación de D-glucosa a partir de extremos no reductores de moléculas oligo- y poli-sacáridos La glucoamilasa también se considera generalmente un tipo de amilasa conocido como amilo-glucosidasa.

50 **[0074]** Tal como se utiliza hererin, el término "amilasa" (CE 3.2.1.1) se refiere a enzimas de escisión de almidón que degradan compuestos de almidón y relacionados por hidrólisis de los enlaces glucosídicos alfa-1,4 y/o alfa-1,6 de una manera endo o exo. Las amilasas incluyen las alfa-amilasas (CE 3.2.1.1); beta-amilasas (3.2.1.2), amilo-amilasas (CE 3.2.1.3), alfa-glucosidasas (CE 3.2.1.20), pululanasa (CE 3.2.1.41), y isoamilasas (CE 3.2.1.68). En algunas realizaciones, la amilasa es una alfa-amilasa.

55 **[0075]** Tal como se utiliza aquí, el término "pectinasa" se refiere a las enzimas que catalizan la hidrólisis de la pectina en unidades más pequeñas tales como oligosacárido o sacáridos monoméricos. En algunas realizaciones, las mezclas de enzimas comprenden cualquier pectinasa, por ejemplo, una endo-poligalacturonasa, una esterasa de metilo de pectina, una endo-galactanasa, una esterasa de acetilo de pectina, una liasa endo-pectina, una liasa de pectato, una ramnosidasa alfa, una exo-galacturonasa, una liasa de exo-poligalacturonato, una hidrolasa de ramnogalacturonano, una liasa de ramnogalacturonano, una esterasa de acetilo de ramnogalacturonano, una galacturonohidrolasa de ramnogalacturonano y/o una xilogalacturonasa.

60 **[0076]** Tal como se utiliza aquí, el término "endo-poligalacturonasa" (CE 3.2.1.15) se refiere a las enzimas que catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces 1,4-alfa-D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también puede ser denominada como "despolimerasa de pectina poligalacturonasa," "pectinasa", "endopoligalacturonasa", "pectolasa", "hidrolasa de pectina," " poligalacturonasa de pectina," "glicanohidrolasa de

poli-alfa-1,4-galacturónido", "endogalacturonasa", "endo-D-galacturonasa," o "poli (1,4-alfa-D-galacturónido) glicanohidrolasa."

5 **[0077]** Tal como se utiliza aquí, el término "esterasa de metilo de pectina" (CE 3.1.1.11) se refiere a las enzimas que catalizan la reacción: pectina + n H₂O = n metanol + pectato. La enzima también puede ser conocida como "esterasa de pectina", "demetoxilasa de pectina," "metoxilasa de pectina," "metilesterasa de pectina", "pectasa", "pectinoesterasa," o "pectilhidrolasa de pectina".

10 **[0078]** Tal como se utiliza aquí, el término "endo-galactanasa" (CE 3.2.1.89) se refiere a las enzimas que catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-galactosídico en arabinogalactanos. La enzima también puede ser conocida como "arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa," "endo-1,4-beta-galactanasa," "galactanasa", "arabinogalactanasa," o "arabinogalactano 4-β-D-galactanohidrolasa".

15 **[0079]** Tal como se utiliza aquí, el término "esterasa de acetilo de pectina" se refiere a las enzimas que catalizan la desacetilación de los grupos de acetilo en los grupos hidroxilo de los residuos GalUA de pectina.

20 **[0080]** Tal como se utiliza aquí, el término "una liasa de endo-pectina" (CE 4.2.2.10) se refiere a las enzimas que catalizan la escisión eliminadora de (1 → 4) éster metílico de alfa-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metilo-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede ser conocida como "liasa de pectina", "transeliminasa de pectina," "liasa de endo-pectina," "transeliminasa polimetilgalacturónica", "metiltranseliminasa de pectina," "pectoliasa", "PL", "PNL", "PMGL," o "(1 → 4) -6-O-metilo-α-D-liasa galacturonana".

25 **[0081]** Tal como se utiliza aquí, el término "liasa de pectato" (CE 4.2.2.2) se refiere a las enzimas que catalizan la escisión eliminadora de (1 → 4)-alfa-D-galacturonano para producir oligosacáridos con 4-desoxi-alfa-D grupos -galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede ser conocida como "transeliminasa poligalacturónica", "transeliminasa de ácido péptico," "liasa de poligalacturonato", "metiltranseliminasa de endopectina", "transeliminasa de pectato", "transeliminasa de endogalacturonato," "liasa de ácido péptico," "liasa péptica", "liasa de ácido alfa-1,4-D-endopoligalacturónico", "liasa PGA", "PPasa-N", "endo-alfa-1,4-ácido de liasa poligalacturónico", "liasa de ácido poligalacturónico", "trans-eliminasa de pectina", "ácido poligalacturónico trans-eliminasa," o "(1 → 4)-alfa-D-liasa de galacturonano".

35 **[0082]** Tal como se utiliza aquí, el término "alfa-ramnosidasa" (CE 3.2.1.40) se refiere a las enzimas que catalizan la hidrólisis de los residuos terminales no reductores alfa-L-ramnosa en alfa-L-ramnosides o alternativamente en ramnogalacturonano. Esta enzima también se conoce como "alfa-L-ramnosidasa T", "alfa-L-ramnosidasa N", o "alfa-L-ramnoidrolasa de ramnósido."

40 **[0083]** Tal como se utiliza aquí, el término "exo-galacturonasa" (CE 3.2.1.82) se refiere a las enzimas que hidrolizan ácido péptico desde el extremo no reductor, la liberación de digalacturonato. La enzima también puede ser conocida como "exo-poli-alfa-galacturonosidasa", "exopoligalacturonosidasa," o "exopoligalacturanosidasa".

45 **[0084]** Tal como se utiliza aquí, el término "exo-galacturano 1,4-alfa galacturonidasa" (CE 3.2.1.67) se refiere a las enzimas que catalizan las reacciones de los siguientes tipos: (1,4-alfa-D-galacturónido)_n + H₂O = (1,4-alfa-D-galacturónido)_{n-i} + D-galacturonato. La enzima también puede ser conocida como "poli [1->4] alfa-D-galacturónido] galacturonohidrolasa", "exopoligalacturonasa", "poli(galacturonato) hidrolasa," "exo-D-galacturonasa", "exo-D-galacturonanasa", "exopoli-D-galacturonasa," o "poli(1,4-alfa-D-galacturónido) galacturonohidrolasa."

50 **[0085]** Tal como se utiliza aquí, el término "liasa de exopoligalacturonato" (CE 4.2.2.9) se refiere a las enzimas que catalizan la escisión eliminadora de 4-(4-desoxi-α-D-galact-4-enuronosilo)-D-galacturonato del extremo reductor de pectato (es decir, pectina deesterificada). Esta enzima puede ser conocida como "pectato de disacárido-liasa", "pectato exo-liasa", "transeliminasa ácido exopéptico", "liasa de exopectato", "ácido-trans-eliminasa exopoligalacturónico", "PATE", "exo-PATE" "exo-PGL," o "(1 → 4)-alfa-D-galacturonano reducción de extremo-disacárido-liasa."

55 **[0086]** Tal como se utiliza aquí, el término "ramnogalacturonanasa" se refiere a las enzimas que hidrolizan el enlace entre el ácido galactosilurónico y ramnopiranosil en una endo-moda en estructuras ramnogalacturonano estrictamente alternantes, que consiste en el disacárido [(1,2-alfa-L-rhamnoyl - ácido (1,4) -alfa-galactosilurónico)].

60 **[0087]** Tal como se utiliza aquí, el término "liasa de ramnogalacturonano" se refiere a las enzimas que escinden enlaces alfa-L-Rap-(1 → 4)-alfa-D-GalpA de una manera endo en ramnogalacturonano por la eliminación beta.

65 **[0088]** Tal como se utiliza aquí, el término "esterasa de acetilo de ramnogalacturonano" se refiere a las enzimas que catalizan la deacetilación de la columna de la ramnosa alternante y residuos de ácido galacturónico en ramnogalacturonano.

[0089] Tal como se utiliza aquí, el término "ramnogalacturonano galacturonohidrolasa" se refiere a las enzimas que

hidrolizan el ácido galacturónico desde el extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternas de una manera exo. Esta enzima también puede ser conocida como "hidrolasa de xilogalacturonano."

5 **[0090]** Tal como se utiliza aquí, el término "endo-arabinanasa" (CE 3.2.1.99) se refiere a las enzimas que catalizan la endohidrolisis de enlaces 1,5-alfa-arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también puede ser conocida como "endo-arabinasa", "arabinano endo-1,5- α -L-arabinosidasa," "endo-1,5-alfa-L-arabinanasa", "endo-alfa-1,5-arabanasa", "endo-arabanasa," o "1,5-alfa-L-arabinano 1,5-alfa-L-arabinanohidrolasa. "

10 **[0091]** Como se usa en este documento, "proteasa" incluye enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (peptidasas), así como enzimas que hidrolizan enlaces entre péptidos y otros restos, tales como azúcares (glicopeptidasas). Muchas proteasas se caracterizan bajo CE 3.4, y son adecuadas para uso en la presente invención. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen, pero no se limitan a, proteasas de cisteína, incluyendo pepsina, papaína y proteasas de serina incluyendo quimotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.

15 **[0092]** Como se usa en este documento, "lipasa" incluye enzimas que hidrolizan los lípidos, ácidos grasos, y acilglicéridos, incluyendo fosfoglicéridos, lipoproteínas, diacilgliceroles, y similares. En las plantas, los lípidos se utilizan como componentes estructurales para limitar la pérdida de agua y la infección por patógenos. Estos lípidos incluyen ceras derivadas de ácidos grasos, así como la cutina y suberina.

20 **[0093]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "aislado" y "purificado" se usan para referirse a una molécula (por ejemplo, un ácido nucleico aislado, polipéptido [incluyendo, pero no limitado a enzimas], etc.) u otro componente que es eliminado a partir de al menos otro componente con el que está asociado de forma natural. Por lo tanto, los términos se refieren a un material que se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si es de origen natural). Se pretende que el término abarque cualquier método adecuado para la eliminación de al
25 menos un componente con el que la molécula se asocia de forma natural. En algunas realizaciones, los términos también abarcan las células que están separadas de otras células y/o componentes de medios. Se pretende que cualquier método de separación adecuado encuentra uso en la presente invención. En algunas realizaciones, se dice que un material sea "purificado" cuando esté presente en una composición en particular en una concentración más alta o más baja que existe en un organismo de tipo salvaje de origen natural o o en combinación con
30 componentes normalmente no presentes en la expresión de un organismo de tipo silvestre en la naturaleza. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente en un animal vivo de origen natural no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. En algunas realizaciones, tales polinucleótidos son parte de un vector, y/o tales polinucleótidos o polipéptidos son parte de una composición, y todavía se consideran aislados, ya que tal vector o composición no es
35 parte de su entorno natural. En algunas realizaciones, se dice que un ácido nucleico o proteína se purifica, por ejemplo, si da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético o blot.

[0094] El término "aislado", cuando se utiliza en referencia a una secuencia de ADN, se refiere a una secuencia de ADN que ha sido removida de su entorno genético natural y así está libre de otras secuencias de codificación
40 extrañas o no deseadas y está en una forma conveniente para el uso en sistemas de producción de la proteína mediante ingeniería genética. Estas moléculas aisladas son aquellas que se separan de su ambiente natural y son clones genómicos y ADNc. Las moléculas de ADN aisladas de la invención presente están libres de otros genes que están asociados, pero puede incluir regiones no traducidas 5' y 3' producidas naturalmente (por ejemplo, promotores y terminadores). La identificación de regiones asociadas será evidente a alguien de habilidad ordinaria en el arte
45 (véase por ejemplo, Dynan y Tijan, Nature 316:774-78 [1985]). El término "una secuencia aislada de ADN" también conocida como "una secuencia de ADN clonada".

[0095] El término "aislado", cuando se utiliza en referencia a una proteína, se refiere a una proteína que se encuentra en una condición que no sea su entorno nativo. En algunas realizaciones, la proteína aislada es
50 sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente de otras proteínas homólogas. Una proteína aislada es más de 10% puro, preferiblemente de más de 20% puro y aún más preferiblemente más de cerca del 30% según lo determinado por SDS-PAGE. Otros aspectos de la invención comprenden la proteína en una forma altamente purificada (es decir, más de aproximadamente 40% puro, más de aproximadamente 60% puro, más de aproximadamente 70% puro, más de aproximadamente 80% puro, más de aproximadamente 90% puro, más de
55 aproximadamente 95% puro, más de aproximadamente 97% puro, más de aproximadamente 98% puro, o incluso más de aproximadamente 99% puro), según lo determinado por SDS-PAGE.

[0096] Por "purificación" o "aislamiento", cuando se utiliza en referencia a la deshidrogenasa de la celobiosa, se entiende que la deshidrogenasa de celobiosa es alterada de su estado natural en virtud de la separación de la
60 deshidrogenasa de celobiosa de todos o algunos de los componentes naturales con los que se asocia en la naturaleza. Esto puede ser logrado por cualquier método adecuado, incluyendo técnicas de separación de arte reconocida, incluyendo pero no limitado a cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, separación de hidrofóbico, diálisis, tratamiento con proteasas, precipitación de sulfato de amonio u otra precipitación de sales de proteína, centrifugación, cromatografía por exclusión de tamaño, filtración, microfiltración, gel-
65 electroforesis, separación en un gradiente o cualesquiera otros métodos adecuados, para eliminar restos celulares, impurezas, células enteras, proteínas extrañas, o las enzimas no deseadas en la composición final. Es después más

posible agregar componentes a la composición que contienen deshidrogenasa de celobiosa que proporcionan beneficios adicionales, por ejemplo, activación de agentes, agentes anti-inhibición, iones deseables, compuestos para controlar pH, otras enzimas, etc.

5 **[0097]** Según lo utilizado aquí, la frase "polipéptido substancialmente puro" se refiere a una composición en la que la especie de polipéptido es la especie predominante presente (es decir, en base molar o en peso, es más abundante que cualquier otra especie de macromoléculas individuales en la composición) y es una composición generalmente substancialmente purificada cuando la especie objeto consta de al menos 50 por ciento de las especies macromoleculares presentes en mol o % en peso. En general, una composición de enzima sustancialmente pura
10 estará integrada por aproximadamente 60% o más, aproximadamente 70% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 90% o más, aproximadamente 95% o más, o aproximadamente 98% o más de especies macromoleculares por mol o % en peso presentes en la composición. Especies solventes, moléculas pequeñas < 500 Daltons), y especies de iones elementales no se consideran macro especies moleculares.

15 **[0098]** En este documento, el término "proceso de purificación" usado en referencia a una mezcla de enzimas comprende cualquier proceso que elimina físicamente un componente no deseado de la mezcla de la enzima. Así, en algunas realizaciones, procesos de depuración estipulados en este documento incluyen metodologías de purificación que eliminan físicamente actividad oxidante de celobiosa, la enzima mezcla o viceversa. Se contempla que cualquier proceso de purificación adecuado conocido en el arte encuentra uso en la invención presente. De
20 hecho, no se pretende que la invención presente se limite a cualquier proceso de depuración especial.

[0099] En este documento, el término "mezcla libre de enzimas" comprende las enzimas que se han separado de las células, incluyendo las células que secretan las enzimas. Mezclas de enzimas libres de células pueden prepararse por cualquiera de una variedad de metodologías que son conocidas en el arte, como las metodologías de filtración o
25 centrifugación. En algunas realizaciones, la mezcla de enzimas, por ejemplo, puede ser parcialmente libre de células, substancialmente libre de células o totalmente libre de células.

[0100] Como se utiliza en este documento, "polinucleótido" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en cualquier forma simple o de doble cadena y sus complementos.
30

[0101] Se dice que un polinucleótido "codifica" un ARN o un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula por métodos conocidos por expertos en la técnica, puede ser transcrito y traducido para producir el ARN, el polipéptido o un fragmento de ella. También se dice que la cadena anti-sentido de tal ácido nucleico codifica las secuencias. Como se conoce en el arte, se puede transcribir el ADN por una polimerasa del ARN para producir
35 ARN, pero ARN puede ser inversamente transcrito por la transcriptasa inversa para producir un ADN. Así, una molécula de ADN puede codificar eficazmente una molécula ARN y viceversa.

[0102] Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Además, los términos "aminoácido", "polipéptido" y "péptido" abarcan los aminoácidos naturales y sintéticos, así como análogos de aminoácidos. Aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son posteriormente modificados (por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina).
40

[0103] Según lo utilizado adjunto, "proteína de interés" y "polipéptido de interés" se refiere a un polipéptido/proteína que se desea o se evalúa. En algunas realizaciones, la proteína de interés se expresa intracelularmente, mientras que en otras realizaciones, es un polipéptido secretado. En algunas realizaciones, la "proteína de interés" o "polipéptido de interés" incluye las enzimas de la invención presente. En algunas realizaciones, la proteína de interés es un polipéptido secretado que está unido a un péptido señal (es decir, una extensión amino-terminal de una proteína para ser secretada). Casi todas las proteínas secretadas utilizan una extensión de proteína amino-terminal que desempeña un papel crucial en la orientación y translocación de proteínas precursoras a través de la membrana. Esta extensión se retira proteolíticamente por una peptidasa de señal durante o inmediatamente después de transferencia de membrana.
45
50

[0104] Tal como se usa en el presente documento, el término "análogos de aminoácidos" se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural (es decir, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo de carboxilo, un grupo de amino, y un grupo R, incluyendo, pero no limitado a homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, y sulfonio de metilo de metionina). En algunas realizaciones, estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) y/o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural.
55
60

[0105] Los aminoácidos se denominan en el presente documento por cualquiera de sus comúnmente conocidos símbolos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden denominarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptada.
65

[0106] Un aminoácido o "posición" de bases de nucleótidos se designa por un número que identifica

secuencialmente cada aminoácido (o de bases de nucleótidos) en la secuencia de referencia en función de su posición relativa al N-terminal (o extremo 5'). Debido a deleciones, inserciones, truncamientos, fusiones, y similares, que deben tenerse en cuenta al determinar un alineamiento óptimo, el número de residuos de aminoácidos en una secuencia de prueba simplemente determinada por el recuento desde el extremo N-terminal, no será necesariamente el mismo que el número de su posición correspondiente en la secuencia de referencia. Por ejemplo, en un caso en el que una secuencia de prueba tiene una deleción en relación con una secuencia de referencia alineada, no habrá ningún aminoácido en la variante que corresponde a una posición en la secuencia de referencia en el sitio de eliminación. Donde haya una inserción en una secuencia de prueba alineada, esa inserción no corresponderá a una posición de aminoácido numerado en la secuencia de referencia. En el caso de truncamientos o fusiones no puede haber tramos de aminoácidos, ya sea en la referencia o secuencia alineada que no corresponden a ningún aminoácido en la secuencia correspondiente.

[0107] Los términos "secuencia de tipo silvestre" y "secuencia de origen natural" se usan indistintamente en este documento, para referirse a una secuencia de polipéptido o polinucleótido que es nativa o de origen natural en una célula huésped. En algunas realizaciones, la secuencia de tipo salvaje se refiere a una secuencia de interés que es el punto de partida de un proyecto de ingeniería de proteínas. La secuencia de tipo silvestre puede codificar o bien un homólogo o proteína heteróloga. Una proteína homóloga es una que la célula huésped produciría sin intervención. Una proteína heteróloga es una que la célula huésped no produciría salvo por la intervención.

[0108] Como se usa en este documento, "enzima de origen natural" se refiere a una enzima que tiene la secuencia de aminoácidos no modificada idéntica a la encontrada en la naturaleza (es decir, "de tipo silvestre"). Naturalmente enzimas que se producen incluyen enzimas nativas (es decir, aquellas enzimas expresadas de manera natural o que se encuentran en el microorganismo particular).

[0109] Tal como se utiliza aquí, el término "enzima de referencia" se refiere a una enzima para la que otra enzima de la presente invención (por ejemplo, una enzima "test") se compara con el fin de determinar la presencia de una propiedad mejorada en la otra enzima que se está evaluando. En algunas realizaciones, una enzima de referencia es una enzima de tipo silvestre. En algunas formas de realización, la enzima de referencia es una enzima a la que una enzima de ensayo de la presente invención se compara con el fin de determinar la presencia de una propiedad mejorada en la enzima de prueba que está siendo evaluada, incluyendo pero no limitado a la mejora de termoactividad, la mejora de la termoestabilidad, y/o estabilidad mejorada. En algunas realizaciones, una enzima de referencia es una enzima de tipo silvestre.

[0110] Tal como se utiliza aquí, el término "fragmento biológicamente activo" se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino-terminal y/o carboxi-terminal y/o deleción interna, pero donde la secuencia de aminoácido restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia a la que está siendo comparada y que retiene sustancialmente toda la actividad del polipéptido de longitud completa.

[0111] Tal como se utiliza aquí, el término "recombinante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no se produce naturalmente en una célula huésped. En algunas realizaciones, las moléculas recombinantes contienen dos o más secuencias de origen natural que están unidas entre sí de una manera que no se produce naturalmente. En algunas realizaciones, "células recombinantes" expresan genes que no se encuentran en forma idéntica dentro de la forma nativa (es decir, no recombinante) de la célula y/o expresan genes nativos que de otro modo son anormalmente sobreexpresados, bajo-expresados, y/o no se expresa en absoluto debido a la intervención humana deliberada. Las células recombinantes contienen al menos un polinucleótido recombinante o polipéptido. Una construcción de ácido nucleico, el ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido), polipéptido, o célula huésped se denomina aquí "recombinante" cuando no es de origen natural, artificial o procesado. "Recombinación", "recombinaneó" y la generación de un ácido nucleico "recombinado" generalmente abarcan el conjunto de al menos dos fragmentos de ácido nucleico. La presente descripción también proporciona una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende al menos una secuencia de polinucleótido de CDH que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas al complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0112] Los ácidos nucleicos "se hibridan" cuando se asocian, típicamente en solución. Los ácidos nucleicos se hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como enlaces de hidrógeno, exclusión de disolvente, apilamiento de bases y similares. En la presente memoria, el término "condiciones rigurosas de lavado de hibridación" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como hibridaciones Southern y Northern, son dependientes de secuencia y son diferentes bajo parámetros ambientales diferentes. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen de 1993, "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes", Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York). Para polinucleótidos de al menos 100 nucleótidos de longitud, de condiciones de astringencia bajas a muy altas se definen como sigue: prehibridación e hibridación a 42°C en 5xSSPE, 0,3% de SDS, 200 µg/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y, o bien 25% de formamida para astringencias bajas, formamida al 35% para los rigores medio-alto y medio, o el 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos de transferencia Southern estándares. Para polinucleótidos de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces cada

uno durante 15 minutos usando 2xSSC, 0,2% SDS a 50°C (astringencia baja), a 55°C (astringencia media), a 60°C (astringencia media-alta), a 65°C (rigurosidad alta), o a 70°C (astringencia muy alta).

5 **[0113]** Condiciones moderadamente rigurosas abarcan las conocidas en la técnica y se describen en varios textos estándar, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS). Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas implica la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: 20% formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM de citrato trisódico), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El técnico experto
10 sabrá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de la sonda y similares.

15 **[0114]** Tal como se usa en algunas realizaciones de este documento, las condiciones rigurosas o condiciones de alta rigurosidad utilizan: (1) baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo 0,015 M de cloruro sódico/0,0015 M de citrato sódico/0,1% de dodecilsulfato de sodio a 50°C; (2) durante la hibridación de un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) 50% de formamida, 5 x SSC.

20 **[0115]** (0,75 M NaCl, citrato de sodio 0,075 M) 50 (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 mg/ml), 0,1% de SDS, y 10 % de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% de formamida a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad consistente en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

25 **[0116]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "biblioteca de mutantes" y "biblioteca de variantes" se usa en referencia a las células, se refieren a una población de células que son idénticas en la mayor parte de su genoma, pero incluyen diferentes homólogos de uno o más genes. Tales bibliotecas se pueden utilizar, por ejemplo, para identificar genes o operones con rasgos mejorados. Cuando se utiliza en referencia a polipéptidos o ácidos nucleicos, "biblioteca" se refiere a un conjunto (es decir, una pluralidad) de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. Una biblioteca se compone de "miembros". Las diferencias de secuencia entre miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tomar la forma de una simple mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede ser en forma de organismos o células, por ejemplo, bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos.
30

35 **[0117]** Tal como se utiliza aquí, el término "gen de partida" se refiere a un gen de interés que codifica una proteína de interés que se va a mejorar, suprimido, mutado, y/o cambiado de otro modo utilizando la presente invención.

40 **[0118]** El término "propiedad" y sus equivalentes gramaticales en el contexto de un ácido nucleico, como se usa aquí, se refiere a cualquier característica o atributo de un ácido nucleico que se puede seleccionar o detectar. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a, una propiedad que afecta a la unión a un polipéptido, una propiedad conferida a una célula que comprende un ácido nucleico particular, una propiedad que afecta a la transcripción de genes (por ejemplo, la fuerza del promotor, el reconocimiento del promotor, la regulación del promotor, y/o potenciador de la función), una propiedad que afecta el procesamiento del ARN (por ejemplo, el empalme de ARN, la estabilidad del ARN, la conformación de ARN y/o modificación post-transcripcional), una traducción que afectan a la propiedad (por ejemplo, el nivel, la regulación, la unión del ARNm de las proteínas ribosomales, y/o modificación posterior a la traducción). Por ejemplo, un sitio de unión para un factor de transcripción, la polimerasa, el factor regulador, etc., de un ácido nucleico se puede alterar para producir características deseadas o para identificar características no deseables.
45

50 **[0119]** El término "propiedad" y sus equivalentes gramaticales en el contexto de un polipéptido (incluyendo las proteínas), como se usa aquí, se refiere a cualquier característica o atributo de un polipéptido que se puede seleccionar o detectar. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a la estabilidad oxidativa, la especificidad de sustrato, actividad catalítica, la estabilidad térmica, la estabilidad alcalina, perfil de actividad del pH, resistencia a la degradación proteolítica, k_m , k_{cat} , k_{cat}/k_m ratio, plegamiento de proteínas, la inducción de una respuesta inmune, la no inducción de una respuesta inmune, la capacidad para unirse a un ligando, la capacidad de unirse a un receptor, la capacidad de ser secretada, la capacidad para que se muestre en la superficie de una célula, la capacidad de oligomerizar, la capacidad de señalizar, la capacidad de estimular la proliferación celular, la capacidad para inhibir la proliferación celular, la capacidad de inducir apoptosis, la capacidad de ser modificado por fosforilación o glicosilación, y/o la capacidad para tratar la enfermedad, etc. De hecho, no se pretende que la presente invención
55 esté limitada a cualquier propiedad particular.
60

[0120] Como se usa en este documento, "similitud" se refiere a una sustitución de aminoácido idéntica o conservadora de los mismos como se define a continuación. De acuerdo con ello, un cambio a una sustitución idéntica o conservadora para los fines de similitud se considera que no comprende un cambio. Una delección de un aminoácido o una sustitución de aminoácido no conservadora se considera en este documento como comprensiva de un cambio. El cálculo de la similitud de porcentaje se realiza de la misma manera que se realizó para el
65

porcentaje de identidad.

[0121] Como se usa aquí, "sustitución conservadora", tal como se utiliza con respecto a los aminoácidos, se refiere a la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son bien conocidos en la técnica y se describen en numerosos libros de texto. Los intercambios que ocurren con más frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly, así como éstos a la inversa. En la presente memoria, un sustituto conservador de un residuo es otro residuo en el mismo grupo.

[0122] En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos conservadora puede ser una sustitución, tales como las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla A. Las sustituciones mostradas están basadas en las propiedades físico-químicas de aminoácidos, y como tal, son independientes del organismo. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido conservadora es una sustitución que aparece bajo el encabezado de sustituciones ejemplares.

Tabla A. Sustituciones		
Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	pro; ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe	Leu
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala	Leu

[0123] Tal como se usa en el presente documento, los términos "numerados con referencia a" o "correspondiente a", cuando se utiliza en el contexto de la numeración de un aminoácido dado o secuencia de polinucleótidos, se refiere a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia especificada cuando la secuencia dada de aminoácidos o de polinucleótidos se compara con la secuencia de referencia.

[0124] La siguiente nomenclatura se puede usar para describir sustituciones en una secuencia de referencia con respecto a una secuencia de referencia o un polipéptido variante o secuencia de ácido nucleico: "R-#-V", donde # se refiere a la posición en la secuencia de referencia, R se refiere al aminoácido (o base) en esa posición en la secuencia de referencia, y V se refiere al aminoácido (o base) en esa posición en la secuencia variante.

[0125] El término "conjunto de sustitución de aminoácido" o "conjunto de sustitución" se refiere a un grupo de sustituciones de aminoácidos. Un conjunto de sustitución puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más sustituciones de aminoácidos.

[0126] Como se usa en el presente documento, "identidad" y "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales (por ejemplo, la cuota de al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 88% de identidad, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos

aproximadamente 99% de identidad) a través de una región determinada a una secuencia de referencia, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada según se mide usando algoritmos de comparación de una secuencia o mediante alineamiento manual e inspección visual. En algunas realizaciones, los términos "porcentaje de identidad", "% de identidad", "por ciento idéntico," y "% idéntico," se utilizan indistintamente en este documento para referirse al por ciento de ácido amino a la identidad de secuencia de polinucleótidos que se obtiene por análisis de ClustalW (versión W 1.8 disponible en el Instituto Europeo de Bioinformática, Cambridge, Reino Unido), contando el número de coincidencias idénticas en la alineación y dividiendo tal número de coincidencias idénticas por la longitud de la secuencia de referencia, y utilizando los siguientes parámetros ClustalW para lograr alineaciones óptimas por pares lentas/más precisas - ADN/penalización abierta de vacío de proteína: 15/10; ADN/penalización de extensión de vacío de proteína: 6,66/0,1; matriz de peso de proteínas: series Gonnet; matriz de peso de ADN: Identidad.

[0127] Dos secuencias están "alineadas" cuando están alineadas para la puntuación de similitud utilizando una matriz de sustitución de aminoácidos definida (por ejemplo, BLOSUM62), penalización de existencia de vacío y penalización de extensión de espacio con el fin de llegar a la puntuación más alta posible para ese par de secuencias. Matrices de sustitución de aminoácidos y su uso en la cuantificación de la similitud entre dos secuencias son bien conocidas en la técnica (Véase, por ejemplo, Dayhoff et al., en Dayhoff [ed.], Atlas of Protein Sequence and Structure", Vol. 5, Supl. 3, Natl Biomed Res redondo, Washington DC [1978]; pp 345-352; y Henikoff et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 89: 10.915 a 10.919 [1992]). La matriz BLOSUM62 se usa a menudo como una sustitución de la matriz de puntuación por defecto en los protocolos de alineamiento de secuencias tales como Gapped BLAST 2.0. La penalización de existencia de vacío se impone por la introducción de un solo vacío de aminoácidos en una de las secuencias alineadas, y la penalización por extensión de vacío se impone para cada posición de aminoácido adicional vacía insertada en un vacío ya abierto. La alineación se define por la posición de aminoácidos de cada secuencia en la que la alineación comienza y termina, y, opcionalmente, por la inserción de un vacío o múltiples vacíos en una o ambas secuencias con el fin de llegar a la puntuación más alta posible, mientras que la alineación y la puntuación óptima se puede lograr de forma manual, el proceso se ve facilitado por el uso de un algoritmo de alineación implementado por ordenador (por ejemplo, BLAST con vacíos 2,0.; Véase, Altschul y otros, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 [1997]), y puesto a disposición del público en la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica). Alineaciones óptimas, incluyendo múltiples alineaciones se pueden preparar usando los programas fácilmente disponibles, tales como PSI-BLAST (Véase, por ejemplo, Altschul et al., supra).

[0128] La presente descripción también proporciona una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos CDH que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con la complementaria de un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Se dice que dos ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos que tienen identidad de secuencia 100% son "idénticas". Se dice que una secuencia de ácido nucleico o polipéptido tiene "identidad de secuencia sustancial" de una secuencia de referencia cuando las secuencias tienen al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% , o al menos aproximadamente 99%, o más identidad de secuencia como se determina utilizando los métodos descritos en el presente documento, tales como BLAST utilizando parámetros estándar.

[0129] Como se usa en este documento, un "péptido señal de secreción" puede ser un propéptido, un prepéptido o ambos. Por ejemplo, el término "propéptido" se refiere a un precursor de la proteína que se escinde para producir una "proteína madura." El péptido señal se escinde de la pre-proteína por una peptidasa señal antes de la secreción para producir proteína "madura" o "secretada". Los términos "prepéptido" y "pre-proteína" se refieren a un polipéptido sintetizado con un péptido señal N-terminal que se dirige a él para la secreción. De acuerdo con ello, un "pre-propéptido" es un polipéptido que contiene un péptido señal que dirige el polipéptido para la secreción y que se escinde para producir un polipéptido maduro. Los péptidos de señal se encuentran en el extremo N-terminal de la proteína y por lo general se componen de entre 6 y 136 aminoácidos básicos e hidrófobos.

[0130] Como se usa en este documento, "transcripción" y términos similares se refieren a la conversión de la información codificada en un gen para un transcrito de ARN. De acuerdo con ello, una reducción del nivel de la transcripción de una enzima oxidante de celobiosa es una reducción en la cantidad de ARN transcrito de una codificación de ARN para una enzima oxidante celobiosa.

[0131] Tal como se usa en el presente documento, los términos "constructo de ADN" y "ADN transformante" se utilizan indistintamente para referirse a ADN utilizado para introducir secuencias en una célula huésped u organismo. El ADN puede ser generado *in vitro* por PCR o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, el constructo de ADN comprende una secuencia de interés (por ejemplo, como una "secuencia de entrada"). En algunas realizaciones, la secuencia está unida operativamente a elementos adicionales, tales como elementos de control (por ejemplo, promotores, etc.). En algunas realizaciones, el constructo de ADN comprende además al menos un marcador seleccionable. En algunas realizaciones adicionales, la construcción de ADN comprende una secuencia de entrada flanqueada por cajas de homología. En algunas realizaciones adicionales, el

ADN transformante comprende otras secuencias no homólogas, añadidas a los extremos (por ejemplo, secuencias rellenadoras o flancos). En algunas formas de realización, los extremos de la secuencia de entrada se cierran de manera que el ADN transformante forma un círculo cerrado. Las secuencias de transformación pueden ser de tipo silvestre, mutante o modificado. En algunas realizaciones, el constructo de ADN comprende secuencias homólogas al cromosoma de la célula huésped. En algunas otras realizaciones, el constructo de ADN comprende secuencias no homólogas. Una vez que la construcción de ADN se ensambla *in vitro*, puede utilizarse para: 1) insertar secuencias heterólogas en una secuencia diana deseada de una célula huésped; 2) mutagenizar una región del cromosoma de la célula huésped (es decir, en lugar de una secuencia endógena con una secuencia heteróloga); 3) eliminar los genes diana; y/o 4) introducir un plásmido de replicación en el huésped. En algunas realizaciones, la secuencia de entrada comprende al menos un marcador seleccionable. Esta secuencia puede codificar una o más proteínas de interés. Puede tener otras funciones biológicas. En muchos casos, la secuencia de entrada comprende al menos un marcador seleccionable, tal como un gen que confiere resistencia a los antimicrobianos.

[0132] Como se usa en este documento, un "vector" es una construcción de polinucleótido para la introducción de una secuencia de polinucleótido en una célula. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de control adecuada unida operativamente a y capaz de efectuar la expresión del polipéptido codificado en la secuencia de polinucleótido en un huésped adecuado. Un "vector de expresión" tiene una secuencia de promotor unido operativamente a la secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, transgén) para conducir la expresión en una célula huésped, y en algunas realizaciones una secuencia de terminación de la transcripción. En algunas realizaciones, los vectores son vectores de delección. En algunas realizaciones, los vectores comprenden secuencias de polinucleótidos que producen pequeños ARN de interferencia o transcritos de ARN antisentido que interfieren con la traducción de una secuencia de polinucleótido diana.

[0133] Tal como se utiliza aquí, un "vector de eliminación" comprende secuencias de polinucleótidos homólogas a secuencias de polinucleótidos 5' y 3' a una secuencia diana que se suprime de un genoma del huésped a fin de dirigir la recombinación y la sustitución de la secuencia diana con un polinucleótido entre las secuencias de diana 5' y 3'.

[0134] Tal como se utiliza aquí, el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, y modificación post-traducciona. En algunas realizaciones, el término también abarca la secreción del polipéptido a partir de una célula. En general, el término "expresión" se refiere a la conversión de la información codificada en un gen para la proteína codificada por ese gen. Por lo tanto, una "reducción de la cantidad de una enzima oxidante de celobiosa expresada" es una reducción en la cantidad de la enzima oxidante de celobiosa que finalmente se traduce por la célula.

[0135] Tal como se utiliza aquí, el término "sobreexpresar" pretende abarcar el aumento de la expresión de una proteína a un nivel mayor que el que la célula produce normalmente. Se pretende que el término abarque la sobreexpresión de proteínas endógenas, así como las heterólogas. En algunas formas de realización, la sobreexpresión incluye una tasa de transcripción elevada y/o el nivel del gen en comparación con la tasa de transcripción endógena y/o el nivel de ese gen. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un gen heterólogo se introduce en una célula fúngica para expresar un gen que codifica una enzima heteróloga, tal como una beta-glucosidasa de otro organismo. En algunas otras realizaciones, un gen heterólogo se introduce en una célula fúngica para sobreexpresar un gen que codifica una enzima homóloga tal como una beta-glucosidasa.

[0136] En algunas realizaciones, el gen heterólogo es un gen que ha sido modificado para sobreexpresar el producto del gen. En algunas realizaciones, "sobreexpresión" se refiere a cualquier estado en el que se produce un gen que se expresa a un ritmo elevado o nivel en comparación con la tasa de expresión endógena o nivel para ese gen. En algunas formas de realización, la sobreexpresión incluye velocidad de traducción elevada y/o el nivel del gen en comparación con la tasa de traducción endógena y/o el nivel de ese gen.

[0137] Tal como se utiliza aquí, el término "produce" se refiere a la producción de proteínas y/u otros compuestos por las células. Se pretende que el término abarque cualquier paso implicado en la producción de polipéptidos, incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, y modificación post-traducciona. En algunas realizaciones, el término también abarca la secreción del polipéptido a partir de una célula.

[0138] Como se usa en este documento, una "deshidrogenasa de celobiosa que se secreta por una célula" es una deshidrogenasa de celobiosa producida por la célula de una manera tal que la deshidrogenasa de celobiosa se exporta a través de una membrana de la célula y después se libera posteriormente en el medio extracelular, tales como en medios de cultivo.

[0139] En la presente memoria, una "secuencia de polinucleótido que ha sido adaptada para la expresión" es una secuencia de polinucleótido que se ha insertado en un vector de expresión o de otra manera modificada para contener los elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido en la célula huésped, posicionados de tal manera que permiten la expresión del polinucleótido en la célula huésped. Tales elementos reguladores necesarios para la expresión incluyen secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la

transcripción y, opcionalmente, secuencias potenciadoras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una secuencia de polinucleótido se inserta en un plásmido adaptado para la expresión en la célula huésped fúngica.

5 **[0140]** Tal como se utiliza aquí, el término "plásmido" se refiere a una construcción de doble cadena circular (ds) de ADN utilizado como vector de clonación. En algunas formas de realización, los plásmidos que forman un elemento genético auto-replicante extracromosómico en algunos eucariotas y/o procariontes, mientras que en algunas otras realizaciones, los plásmidos se integran en el cromosoma de la célula huésped.

10 **[0141]** En la presente memoria, una "secuencia de control" incluye todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido de la presente divulgación. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña al polinucleótido de interés. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, los líderes, secuencias de poliadenilación, secuencias de propéptido, promotores, secuencias de péptido señal, y terminadores de la transcripción.

15 **[0142]** Tal como se usa en este documento, "unido operativamente" se refiere a una configuración en la que se coloca adecuadamente una secuencia de control (es decir, en una relación funcional) en una posición relativa a un polinucleótido de interés de tal manera que la secuencia de control dirige o regula la expresión del polinucleótido y/o polipéptido de interés.

20 **[0143]** Tal como se usa en el presente documento, un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN que codifica un líder secretor (es decir, un péptido señal), está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilita la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o garces se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

30 **[0144]** Tal como se utiliza aquí, el término "gen" se refiere a un polinucleótido (por ejemplo, un segmento de ADN), que codifica un polipéptido, e incluye las regiones anteriores y posteriores a las regiones de codificación, así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

35 **[0145]** En la presente memoria, un gen "endógeno" o "homólogo" se refiere a un gen (incluyendo, pero no limitado al tipo silvestre) que se encuentra en una cepa parental de una célula huésped (por ejemplo, hongos o célula bacteriana). Tal como se usa en el presente documento para hacer comparaciones entre secuencias de ácido nucleico, "genes homólogos" (o genes "homólogos") se refieren a genes de especies diferentes, pero por lo general relacionados, que se corresponden entre sí y que son idénticos o muy similares entre sí. El término abarca genes que están separados por especiación (es decir, el desarrollo de nuevas especies) (por ejemplo, genes ortólogos), así como genes que se han separado por duplicación genética (por ejemplo, genes parálogos).

45 **[0146]** Como se usa en este documento, una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de promotor, péptido señal, secuencia de terminación, etc.) es "heteróloga" a otra secuencia con la que está unida operativamente si las dos secuencias no están asociadas en naturaleza.

50 **[0147]** Tal como se utiliza aquí, una "enzima heteróloga" se refiere a una enzima que es codificada por un "gen heterólogo". Sin embargo, también se contempla que un gen heterólogo codifica una enzima endógena o homóloga, como se describe en el presente documento. En general, el término "gen heterólogo" se refiere a un gen que se produce en una forma que no se encuentra en una cepa parental de la célula fúngica huésped (incluyendo pero no limitado al tipo silvestre). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un gen heterólogo es un gen que se deriva de una especie que es diferente de la especie de la célula fúngica que expresan el gen y equivalentes anamorfos, teleomorfos o taxonómicos reconocidos de la célula fúngica que expresan el gen. En algunas realizaciones, un gen heterólogo es una versión modificada de un gen que es endógeno a la célula fúngica huésped, cuyo gen endógeno ha sido sometido a manipulación y después se introduce o se transforma en la célula huésped. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un gen heterólogo tiene una secuencia codificante endógena, pero tiene modificaciones a la secuencia promotora. Del mismo modo, en algunas realizaciones, un gen heterólogo codifica la misma secuencia de aminoácidos que un gen endógeno, pero tiene modificaciones en el uso de codones o a regiones no codificantes, tales como intrones, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un gen heterólogo comprende modificaciones de la secuencia de codificación para codificar un polipéptido de tipo no silvestre. En algunas otras realizaciones, un gen heterólogo tiene la misma secuencia de promotor, regiones no traducidas 5' y 3' y regiones de codificación como una cepa parental, pero se encuentra en otra región del mismo cromosoma, o en un cromosoma completamente diferente en comparación con una cepa parental de la célula huésped.

65 **[0148]** Tal como se utiliza aquí, el término "introducido" que se utiliza en el contexto de la inserción de una secuencia

de ácido nucleico en una célula, significa transformación, transducción, conjugación, transfección, y/o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica para la inserción de secuencias de ácido nucleico en las células huésped. Cualquier medio adecuado para la introducción de ácido nucleico en células huésped encuentran uso en la presente invención.

5 **[0149]** Tal como se utiliza aquí, los términos "transformado" y "transformación" se usan en referencia a una célula que tiene una secuencia de ácido nucleico no nativo integrado en su genoma o tiene un plásmido episomal que se mantiene a través de múltiples generaciones. En algunas realizaciones, los términos "transformado" y "transformado de forma estable" se refieren a una célula que tiene una secuencia de polinucleótido no nativo (es decir, heterólogo) integrado en su genoma o como un plásmido episomal que se mantiene durante al menos dos generaciones.

10 **[0150]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "célula huésped" y "cepa huésped" se refieren a huéspedes adecuados para los vectores de expresión que comprenden secuencias de polinucleótidos (por ejemplo, ADN) como se describe aquí. En algunas formas de realización, las células huésped son células procarióticas o eucarióticas que han sido transformadas o transfectadas con vectores construidos utilizando técnicas recombinantes tal como se conoce en la técnica. huéspedes transformados son capaces de cualquiera de replicar vectores que codifican al menos una proteína de interés y/o que expresa la proteína deseada de interés. Además, la referencia a una célula de una cepa particular se refiere a una célula parental de la cepa, así como la progenie y derivados modificados genéticamente. Derivados genéticamente modificados de una célula parental incluyen células de la progenie que contienen un genoma modificado o plásmidos episomales que confieren por ejemplo, resistencia a los antibióticos, la mejora de la fermentación, etc. En algunas formas de realización, las células huésped se modifican genéticamente para tener características que mejoran la secreción de la proteína, la estabilidad de proteínas u otras propiedades deseables para la expresión y/o secreción de una proteína. Por ejemplo, troquel de función Alp1 resulta en una célula que es deficiente en proteasa. Troquel de la función *pyr5* resulta en una célula con un fenotipo deficiente en pirimidina. En algunas formas de realización, las células huésped se modifican para eliminar las secuencias de proteínas de codificación de celulasa endógena o de otra manera eliminar la expresión de una o más celulasas endógenas. En algunas formas de realización, la expresión de una o más celulasas endógenas se inhibe para aumentar la producción de celulasas de interés. La modificación genética se puede lograr por cualesquiera técnicas de ingeniería genética adecuadas y/o técnicas microbiológicas clásicas (por ejemplo, mutagénesis química o UV y selección subsiguiente). El uso de tecnología recombinante, moléculas de ácido nucleico se pueden introducir, eliminar, inhibir o modificar, de una manera que resulta en aumento de los rendimientos de enzima en el organismo o en el cultivo. Por ejemplo, troquel de función Alp1 resulta en una célula que es deficiente en proteasa. Troquel de *pyr5* resulta en una célula con un fenotipo deficiente de pirimidina. En algunos procedimientos de ingeniería genética, la recombinación homóloga se utiliza para inducir modificaciones de genes dirigidos al focalizar específicamente un gen *in vivo* para suprimir la expresión de la proteína codificada. En un enfoque alternativo, siRNA, antisentido, y/o la tecnología de ribozima encuentra uso en la inhibición de la expresión génica.

15 **[0151]** Los términos "secuencia modificada" y "genes modificados" se utilizan indistintamente en este documento para hacer referencia a una secuencia que incluye una delección, inserción, sustitución o cualquier otra interrupción de una secuencia de ácido nucleico de origen natural. En algunas realizaciones, el producto de expresión de la secuencia modificada es una proteína truncada (por ejemplo, si la modificación es una delección o interrupción de la secuencia). En algunas realizaciones, la proteína truncada mantiene la actividad biológica. En algunas realizaciones alternativas, el producto de expresión de la secuencia modificada es una proteína alargada (por ejemplo, modificaciones que comprenden una inserción en la secuencia de ácido nucleico). En algunas realizaciones adicionales, una inserción conduce a una proteína truncada (por ejemplo, cuando la inserción resulta en la formación de un codón de parada). Por lo tanto, una inserción puede resultar en una proteína truncada o una proteína alargada como un producto de expresión.

20 **[0152]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "secuencia mutante de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos mutante" y "gen mutante" se usan de manera intercambiable en referencia a una secuencia de nucleótidos que tiene una alteración en al menos un codón que ocurren en una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre de célula de huésped. El producto de expresión de la secuencia mutante es una proteína con una alteración de la secuencia de aminoácidos con respecto al tipo silvestre. En algunas realizaciones, el producto de expresión tiene una capacidad funcional alterada (por ejemplo, el aumento de la actividad enzimática).

25 **[0153]** Tal como se utiliza aquí, el término "aleatorización específica" se refiere a un proceso que produce una pluralidad de secuencias en las que una o varias posiciones han sido asignadas al azar. En algunas realizaciones, la aleatorización se ha completado (es decir, los cuatro nucleótidos, A, T, G y C se pueden producir en una posición al azar). En algunas formas de realización alternativas, la aleatorización de un nucleótido está limitada a un subconjunto de los cuatro nucleótidos. La aleatorización dirigida se puede aplicar a uno o varios codones de una secuencia, que codifica una o varias proteínas de interés. Cuando se expresa, las bibliotecas resultantes producen poblaciones de proteína en el que una o más posiciones de aminoácidos puede contener una mezcla de todos los 20 aminoácidos o un subconjunto de aminoácidos, como se determina por el esquema de aleatorización del codón aleatorio. En algunas realizaciones, los miembros individuales de una población resultante de aleatorización específica difieren en el número de aminoácidos, debido a la inserción dirigida o al azar o delección de codones. En algunas formas de realización adicionales, los aminoácidos sintéticos se incluyen en las poblaciones de proteínas

producidas. En algunas realizaciones adicionales, la mayoría de los miembros de una población resultantes de aleatorización específica muestran una mayor homología de secuencia con la secuencia de consenso que el gen de partida. En algunas realizaciones, la secuencia codifica una o más proteínas de interés. En algunas realizaciones alternativas, las proteínas tienen funciones biológicas diferentes.

[0154] Como se usa en este documento, "supresión" se refiere a la modificación del polipéptido mediante la eliminación de uno o más aminoácidos del polipéptido de referencia. Las deleciones pueden comprender la eliminación de 1 o más aminoácidos, 2 o más aminoácidos, 3 o más aminoácidos, 4 o más aminoácidos, 5 o más aminoácidos, 6 o más aminoácidos, 7 o más aminoácidos, 8 o más aminoácidos, 9 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, o 20 o más aminoácidos, hasta 10% del número total de aminoácidos, o hasta 20% del número total de los aminoácidos que constituyen el polipéptido al tiempo que conserva la actividad enzimática y/o retención de las propiedades mejoradas de una enzima de deshidrogenasa de celobiosa de ingeniería. Las deleciones pueden estar presentes en las partes internas y/o porciones terminales del polipéptido. En algunas formas de realización, la deleción comprende un segmento continuo, mientras que en otras formas de realización, es discontinua.

[0155] Tal como se utiliza aquí, un "gen de supresión" o "mutación de deleción" es una mutación en la que al menos parte de una secuencia de ADN que constituyen el gen que falta. Por lo tanto, una "deleción", en referencia a los ácidos nucleicos es una pérdida o sustitución de material genético que resulta en una interrupción total o parcial de la secuencia de ADN que componen el gen. En algunas realizaciones, se contempla la eliminación completa o casi completa de la secuencia del gen. Sin embargo, una mutación de deleción no tiene que eliminar completamente toda la secuencia del gen para la enzima oxidante de celobiosa con el fin de reducir la actividad de la enzima oxidante de celobiosa endógena secretada por la célula fúngica. Por ejemplo, una deleción parcial que elimina uno o más nucleótidos que codifica un aminoácido en un sitio activo de enzima oxidante de celobiosa, que codifica una señal de secreción, o que codifica otra parte de la enzima oxidante de celobiosa que juega un papel en la actividad de enzima oxidante de celobiosa endógena que se secreta por la célula fúngica. Cualquier número de nucleótidos se puede eliminar, de una sola base de una pieza entera de un cromosoma. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el término "deleción" se refiere a la eliminación de un gen necesario para la codificación de una proteína específica (por ejemplo, *cdh1*). En este caso, la cepa que tiene esta supresión puede ser denominada como una "cepa de deleción".

[0156] Como se usa en el presente documento, "fragmento" se refiere a un polipéptido que tiene una deleción amino-terminal y/o carboxi-terminal y/o interna, en comparación con un polipéptido de referencia, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de referencia. Los fragmentos pueden tener típicamente aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% del polipéptido de deshidrogenasa celobiosa de longitud completa, por ejemplo el polipéptido de SEQ ID NO: 2. En algunos casos, las secuencias de los polipéptidos de deshidrogenasa celobiosa de tipo silvestre de origen no natural y descritos en este documento pueden incluir una metionina (M) residuo (es decir, M en la posición 1) de inicio. Sin embargo, el experto en la técnica reconocerá que este residuo de metionina de iniciación se puede quitar durante el curso del tratamiento biológico de la enzima, tal como en una célula huésped o en el sistema de traducción *in vitro*, para generar una enzima madura que carece del residuo de metionina de iniciación, pero de otra manera retiene las propiedades de la enzima. Por lo tanto, para cada uno de los polipéptidos de deshidrogenasa de celobiosa descritos en este documento que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una metionina de iniciación, la presente descripción también abarca el polipéptido con el residuo de metionina de iniciación borrado (es decir, un fragmento del polipéptido de deshidrogenasa de celobiosa que carece de una metionina en la posición 1).

[0157] Tal como se usa en el presente documento, una "mutación condicional" es una mutación que tiene el fenotipo de tipo silvestre en determinadas condiciones ambientales y un fenotipo mutante en ciertas otras condiciones.

[0158] Tal como se utiliza aquí, el término "selección" tiene su significado usual en la técnica y es, en general, un proceso de múltiples pasos. En el primer paso, se proporciona un polipéptido o variante de ácido nucleico mutante del mismo. En el segundo paso, una propiedad del polipéptido o variante de ácido nucleico mutante se determina. En la tercera etapa, la propiedad determinada se compara con una propiedad del ácido nucleico precursor correspondiente, a la propiedad del correspondiente polipéptido de origen natural o a la propiedad del material de partida (por ejemplo, la secuencia inicial) para la generación del ácido nucleico mutante. Será evidente para el experto en la técnica que el procedimiento de selección para la obtención de un ácido nucleico o proteína con una propiedad alterada depende de la propiedad del material de partida, y cuya modificación la generación del ácido nucleico mutante debería facilitar. Por consiguiente, el experto en la técnica apreciará que la invención no se limita a ninguna propiedad específica que se criba y que la siguiente descripción de propiedades enumera sólo ejemplos ilustrativos. Métodos para la detección de cualquier propiedad en particular se describen en general en la técnica. Por ejemplo, se puede medir la unión, pH óptimos, la especificidad, etc., antes y después de la mutación, en donde un cambio indica una alteración. En algunas realizaciones, las pantallas se realizan de una manera de alto rendimiento, incluyendo múltiples muestras que se examinan de forma simultánea, incluyendo, pero no limitados a ensayos que utilizan chips, presentación de fagos, múltiples sustratos y/o indicadores, y/o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica.

[0159] Tal como se usa en algunas realizaciones, las pantallas abarcan etapas de selección en las que las variantes

de interés se enriquecen a partir de una población de variantes. Ejemplos de estas realizaciones incluyen la selección de variantes que confieren una ventaja de crecimiento para el organismo huésped, así como de presentación en fagos o cualquier otro método de visualización, donde las variantes pueden ser capturadas de una población de variantes en función de sus propiedades de unión o catalíticas. En algunas formas de realización, una biblioteca de variantes está expuesta a estrés (por ejemplo, la exposición al calor, proteasa, o condiciones de desnaturalización). Posteriormente, las variantes que aún están intactas se identifican en una pantalla o se enriquecen por la selección. Se pretende que el término abarque cualquier medio adecuado para la selección. De hecho, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún método particular de cribado.

[0160] Como se usa en este documento, una "célula genéticamente modificada" y/o "célula manipulada genéticamente" (por ejemplo, una "célula fúngica genéticamente modificada" y/o "una célula fúngica modificada genéticamente") es una célula cuyo material genético ha sido alterado utilizando técnicas de manipulación genética. Una célula modificada genéticamente también se refiere a un derivado de, o la progenie de una célula cuyo material genético ha sido modificado mediante técnicas de manipulación genética. Un ejemplo de una modificación genética, como resultado de técnicas de manipulación genética incluye una modificación del ADN genómico; otro ejemplo de una modificación genética, como resultado de técnicas de manipulación genética incluye la introducción de un ácido nucleico heterólogo estable en la célula. Por ejemplo, según lo previsto en el presente documento, una célula fúngica modificada genéticamente según lo previsto en el presente documento es una célula fúngica cuyo material genético ha sido modificado de una manera tal que o bien reduce la cantidad de actividad de enzima oxidante de celobiosa secretada, o bien reduce la capacidad de la enzima secretada para oxidar celobiosa.

[0161] En algunas realizaciones, las secuencias de ADN mutantes se generan mediante mutagénesis de saturación en sitio en al menos un codón. En algunas otras realizaciones, la mutagénesis de saturación en sitio se lleva a cabo para dos o más codones. En algunas realizaciones adicionales, las secuencias de ADN mutantes tienen más de aproximadamente 50%, más de aproximadamente 55%, más de aproximadamente 60%, más de aproximadamente 65%, más de aproximadamente 70%, más de aproximadamente 75%, más de aproximadamente el 80%, más de aproximadamente 85%, más de aproximadamente 90%, más de aproximadamente 95%, o más de aproximadamente 98% de homología con la secuencia de tipo silvestre. En algunas formas de realización alternativas, se genera ADN mutante *in vivo* usando cualquier procedimiento mutagénico conocido adecuado, incluyendo, pero no limitado al uso de radiación, nitrosoguanidina, etc. después se aísla la secuencia de ADN deseada y se utiliza en los métodos proporcionados en este documento.

[0162] Tal como se usa en el presente documento, los términos "de amplificación" y "amplificación génica" se refieren a un método por el cual las secuencias específicas de ADN se replican de forma desproporcionada tal que el gen amplificado se hace presente en un número de copia alto que estaba inicialmente presente en el genoma. En algunas realizaciones, la selección de células mediante crecimiento en presencia de un fármaco (por ejemplo, un inhibidor de una enzima inhibidora) resulta en la amplificación del gen endógeno que codifica el producto génico necesario para el crecimiento en presencia del fármaco o por amplificación de secuencias exógenas (es decir, de entrada) que codifican este producto génico, o ambas. "Amplificación" es un caso especial de replicación de ácido nucleico que implica especificidad de plantilla. Se ha de contrastar con la replicación de la plantilla no específica (es decir, la replicación que es dependiente de la plantilla, pero no depende de una plantilla específica). La especificidad de plantilla aquí se distingue de fidelidad de la replicación (es decir, la síntesis de la secuencia de polinucleótidos apropiada) y de especificidad (ribo- o desoxirribo) de nucleótidos. La especificidad plantilla se describe con frecuencia en términos de especificidad "objetiva". Las secuencias diana son "dianas" en el sentido de que se intenta distinguir de otro ácido nucleico. Las técnicas de amplificación se han diseñado principalmente para esta clasificación.

[0163] Como se usa en este documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, tanto si se producen de forma natural como en un digesto de restricción purificada como si se producen sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca bajo condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como polimerasa de ADN y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es preferentemente de cadena sencilla para una máxima eficiencia en la amplificación, pero puede ser alternativamente de doble cadena. Si bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus cadenas antes de ser utilizado para preparar productos de extensión. En algunas realizaciones, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebador la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Como se conoce en la técnica, las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método.

[0164] Los términos "cebador mutagénico" y "oligonucleótido mutagénico" (usado de forma intercambiable en este documento) se refieren a composiciones de oligonucleótidos que corresponden a una porción de una secuencia molde y que son capaces de hibridarse a la misma. Con respecto a los cebadores mutagénicos, el cebador no coincidirá con precisión con el ácido nucleico de molde, la falta de coincidencia o desajustes en el cebador que se utilizan para introducir la mutación deseada en la biblioteca de ácidos nucleicos.

[0165] Tal como se usa en el presente documento, los términos "cebador no mutagénico" y "oligonucleótido no

mutagénico" (usado de manera intercambiable en el presente documento) están destinados a referirse a composiciones de oligonucleótidos que coinciden precisamente a un ácido nucleico de molde. En algunas realizaciones de la invención, sólo se utilizan cebadores mutagénicos. En algunas otras realizaciones, los cebadores están diseñados de forma que, para al menos una región en la que se ha incluido un cebador mutagénico, también hay cebador no mutagénico incluido en la mezcla de oligonucleótidos. Mediante la adición de una mezcla de cebadores mutagénicos y cebadores no mutagénicos correspondientes a al menos uno de los cebadores mutagénicos, es posible producir una biblioteca de ácido nucleico resultante en la que se presentan una variedad de patrones de mutaciones combinatorias. Por ejemplo, si se desea que algunos de los miembros de la biblioteca de ácidos nucleicos mutantes conservan su secuencia de precursor en ciertas posiciones, mientras que otros miembros son mutantes en tales sitios, los cebadores no mutagénicos proporcionan la capacidad para obtener un nivel específico de miembros no mutantes dentro de la biblioteca de ácido nucleico para un residuo dado. Los métodos de la invención emplean oligonucleótidos mutagénicos y no mutagénicos que son generalmente de entre aproximadamente 10 a 50 bases de longitud, o más preferiblemente, aproximadamente 15 a 45 bases de longitud. Sin embargo, puede ser necesario el uso de cebadores que son ya sea más corto que aproximadamente 10 bases o más de aproximadamente 50 bases para obtener el resultado deseado de mutagénesis. Con respecto a los cebadores mutagénicos y no mutagénicos correspondientes, no es necesario que los oligonucleótidos correspondientes sean de idéntica longitud, sino sólo que no hay solapamiento en la región correspondiente a la mutación que se añade. Los cebadores se pueden añadir en una proporción de pre-definido de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, si se desea que la biblioteca resultante tiene un nivel significativo de una cierta mutación específica y una cantidad menor de una mutación diferente en el mismo o diferente sitio, es posible producir la biblioteca sesgada deseada ajustando la cantidad de cebador adicional. Alternativamente, mediante la adición de cantidades menores o mayores de cebadores no mutagénicos, es posible ajustar la frecuencia con la que la mutación correspondiente se producen en la biblioteca de ácido nucleico mutante.

[0166] Tal como se usa aquí, la frase "mutaciones contiguas" se refiere a las mutaciones que se presentan en el mismo cebador de oligonucleótido. Por ejemplo, las mutaciones contiguas pueden ser adyacentes o próximas entre sí, sin embargo, se pueden introducir en los ácidos nucleicos de molde mutantes resultantes por el mismo cebador.

[0167] Tal como se utiliza aquí, la frase "mutaciones no contiguas" se refiere a las mutaciones que se presentan en los cebadores de oligonucleótidos separados. Por ejemplo, las mutaciones no contiguas se pueden introducir en los ácidos nucleicos de molde mutantes resultantes por cebadores de oligonucleótidos preparados por separado.

[0168] Tal como se utiliza aquí, el término "codón degenerado" se refiere a un codón utilizado para representar un conjunto de diferentes codones (también referido como un "codón ambiguo"). Por ejemplo, el codón degenerado "NNT" representa un conjunto de 16 codones que tienen la secuencia triplete de bases (A, C, T, o G)/(A, C, T, o G)/T.

[0169] Tal como se usa en este documento, "secuencia codificante" se refiere a aquella porción de un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de una proteína (por ejemplo, un gen).

[0170] Tal como se utiliza aquí, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sea de origen natural como en un digesto de restricción purificada o producido sintéticamente, de forma recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz de hibridarse con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias de genes particulares. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención se puede marcar con cualquier "molécula informadora", de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero no limitado a sistemas de enzima (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radioactivos, y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema particular de detección o la etiqueta.

[0171] Tal como se utiliza aquí, el término "diana", cuando se usa en referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, se refiere a la región de ácido nucleico delimitada por los cebadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa. Por lo tanto, se intenta que el "objetivo" se diferencie de otras secuencias de ácidos nucleicos. Un "segmento" se define como una región de ácido nucleico dentro de la secuencia diana.

[0172] Tal como se utiliza aquí, el término "reacción en cadena de polimerasa" (PCR) se refiere a los métodos de la patente de EE.UU. nº 4,683,195 4,683,202, y 4,965,188, que incluyen métodos para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este método para la amplificación de la secuencia diana es bien conocida en la técnica.

[0173] Tal como se usa en el presente documento, el término "reactivos de amplificación" se refiere a aquellos reactivos (trifosfatos de desoxirribonucleótidos, tampón, etc.), necesarios para la amplificación excepto por cebadores, molde de ácido nucleico y enzima de amplificación. Típicamente, los reactivos de amplificación junto con otros componentes de la reacción se colocan y se contienen en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

[0174] Tal como se usa en el presente documento, los términos "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales cortan el ADN bicatenario en o cerca de una secuencia específica de nucleótidos.

5 **[0175]** Un "sitio de restricción" se refiere a una secuencia de nucleótidos reconocida y escindida por una endonucleasa de restricción dada y con frecuencia es el sitio para la inserción de fragmentos de ADN. En algunas realizaciones de la invención, los sitios de restricción están diseñados en el marcador selectivo y en 5' y 3' de la construcción de ADN.

10 **[0176]** Como se usa en este documento, "recombinación homóloga" significa el intercambio de fragmentos de ADN entre dos ecules de ADN en moles o cromosomas emparejados en el sitio de secuencias de nucleótidos idénticas o casi idénticas. En algunas realizaciones, la integración cromosómica es recombinación homóloga.

15 **[0177]** Tal como se utiliza aquí, el término "C1" se refiere a *Myceliophthora thermophila*, incluyendo la cepa fúngica descrita por Garg (Véase, Garg, Mycopathol, 30: 3-4. [1966]).

[0178] Tal como se usa en este documento, "*Chrysosporium lucknowense*" incluye las cepas descritas en la patente de EE.UU. nº 6.015.707, 5.811.381 y 6.573.086; patente publicada de EE.UU. nº 2007/0238155, US 2008/0194005, US 2009/0099079; patente internacional publicada nº WO 2008/073914 y WO 98/15633, e incluyen, sin limitación, *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K, VKM-F 3500 D (nº de acceso VKM F-3500-D), cepa C1 UV13-6 (nº de Acceso VKM F-3632 D), cepa C1 NG7C-19 (nº de acceso VKM F-3633 D), y cepa C1 UV18-25 (VKM F-3631 D), todos los cuales han sido depositados en la II- Russian Collection of Microorganisms of Russian Academy of Sciences (VKM), Bakhurhina St. 8, Moscú, Rusia, 113184, y cualesquiera de sus derivados. Aunque se ha descrito inicialmente como *Chrysosporium lucknowense*, C1 actualmente puede considerarse una cepa de *Myceliophthora thermophila*. Otras cepas C1 incluyen células depositadas con los números de acceso ATCC 44006, CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) 122188, CBS 251.72, CBS 143.77, CBS 272.77, CBS122190, CBS122189 y VKM F-3500D. Derivados ejemplares C1 incluyen organismos en los que uno o más genes endógenos o secuencias han sido borradas o modificadas y/o se han introducido uno o más genes o secuencias heterólogas modificadas. Los derivados incluyen, pero no se limitan a UV18#100f Δ alp1, UV18#100f Δ pyr5 Δ alp1, UV18#100.f Δ alp1 Δ pep4 Δ alp2, UV18#100.f Δ pyr5 Δ alp1 Δ pep4 Δ alp2 y UV18#100.f Δ pyr4 Δ pyr5 Δ alp1 Δ pep4 Δ alp2, como se describe en el documento WO 2008073914 y WO 2010107303.

[0179] Tal como se utiliza aquí, el término "cultivo" se refiere al cultivo de una población de células microbianas en condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. Se contempla que el cultivo se lleva a cabo en cualquier formato adecuado, el equipo (por ejemplo, matraces de agitación, tanques de fermentación, biorreactores, etc.). También se pretende que el cultivo se lleve a cabo utilizando cualquiera de los métodos de proceso adecuados, incluyendo pero no limitado a lote, lote alimentado, y/o cultivo continuo. De hecho, se contempla que cualquier combinación de métodos adecuados podrá usarse.

40 **[0180]** En un "proceso por lotes", todos los materiales necesarios, con la excepción de oxígeno para procesos aeróbicos, se colocan en un reactor al comienzo de la operación y se deja que la fermentación proceda hasta su terminación, en cuyo momento el producto se cosecha. En algunas realizaciones, los procesos por lotes para la producción de las células, enzimas y/o mezclas de enzimas fúngicas de la presente invención se llevan a cabo en un frasco de agitación o un biorreactor.

45 **[0181]** En un "proceso de alimentación por lotes", el cultivo se alimenta de forma continua o secuencial con uno o más componentes de medios sin la eliminación del fluido de cultivo.

[0182] En un "proceso continuo", un medio fresco se suministra y fluido de cultivo se retira continuamente a tasas volumétricamente iguales para mantener el cultivo a una tasa de crecimiento constante. En referencia a los procesos continuos, "estado estacionario" se refiere a un estado en el que la concentración de los reactivos no varía apreciablemente, y "estado casi constante" se refiere a un estado en el que, después de la iniciación de la reacción, la concentración de reactantes fluctúa dentro de un intervalo consistente con el funcionamiento normal del proceso de hidrólisis continuo.

55 **[0183]** Tal como se utiliza aquí, el término "sacarificación" se refiere al proceso en el que los sustratos (por ejemplo, la biomasa celulósica) se descomponen por acción de celulasas para producir azúcares fermentables (monosacáridos, tal como por ejemplo, pero no limitado a, la glucosa).

60 **[0184]** Tal como se utiliza aquí, el término "azúcares fermentables" se refiere a los azúcares simples (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos cortos), incluyendo pero no limitado a la glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa, manosa y sacarosa. De hecho, un azúcar fermentable es cualquier azúcar que un microorganismo puede utilizar o fermentar.

65 **[0185]** Tal como se utiliza aquí, el término "azúcares solubles" se refiere a monómeros y oligómeros de pentosa y hexosa de hasta aproximadamente seis unidades de monómeros solubles en agua. Se pretende que el término

abarque cualesquiera mono- y/o oligosacáridos en agua soluble.

[0186] Tal como se utiliza aquí, el término "fermentación" se utiliza ampliamente para referirse al proceso de obtención de energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos (por ejemplo, hidratos de carbono). En efecto, "fermentación" se refiere ampliamente a la conversión química de una fuente de azúcar de un producto final a través del uso de un organismo de fermentación. En algunas realizaciones, el término abarca el cultivo de un microorganismo o de un cultivo de microorganismos que utilizan azúcares, tales como azúcares fermentables, como fuente de energía para obtener un producto deseado.

[0187] Tal como se utiliza aquí, el término "organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, incluyendo procariotas, así como organismos eucarióticos (por ejemplo, organismos bacterianos, así como organismos de hongos tales como levaduras y hongos filamentosos), adecuados para producir un producto final deseado. Especialmente organismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar (es decir, convertir) azúcares, incluyendo pero no limitado a la glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y/o arabinosa, directa o indirectamente, en al menos un producto final deseado. En algunas realizaciones, la levadura que encuentra uso en la presente invención incluye, pero no se limita a las cepas del género *Saccharomyces* (por ejemplo, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*), cepas del género *Pichia* (por ejemplo, *Pichia stipitis* como *Pichia stipitis* CBS 5773 y *Pichia pastoris*), y cepas del género *Candida* (por ejemplo, *Candida utilis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis* y *Candida boidinii*). Otros organismos de fermentación incluyen, pero no se limitan a cepas de *Zymomonas*, *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorpha* y *Hansenula anomala*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces fragilis*), y *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*).

[0188] Tal como se utiliza aquí, el término "suspensión" se refiere a una solución acuosa en la que se dispersan uno o más componentes sólidos, tales como un sustrato celulósico. Por lo tanto, el término "suspensión" se refiere a una suspensión de sólidos en un líquido. En algunas realizaciones, el sustrato celulósico se pone en suspensión en un líquido a una concentración que es gruesa, pero todavía se puede bombear. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el líquido es agua, una corriente de proceso reciclado, y/o un efluente tratado. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier líquido y/o sólido particular.

[0189] Los términos "biomasa" y "sustrato de biomasa," abarcan cualesquiera materiales adecuados para su uso en reacciones de sacarificación. Los términos abarcan, pero no se limitan a, materiales que comprenden celulosa (es decir, "la biomasa celulósica", "materia prima celulósica," y "sustrato celulósico"), así como la biomasa lignocelulósica. De hecho, el término "biomasa" abarca cualquier material biológico vivo o muerto que contiene un sustrato de polisacárido, incluyendo pero no limitado a la celulosa, almidón, otras formas de polímeros de carbohidratos de cadena larga, y mezclas de tales fuentes. En algunas realizaciones, se monta total o principalmente a partir de glucosa o xilosa, y en algunas realizaciones, opcionalmente también contiene varios otros monómeros de pentosa y/o hexosa. La biomasa puede ser derivada de plantas, animales o microorganismos, e incluye, pero no se limita a residuos agrícolas, industriales y forestales, residuos industriales y municipales, y las plantas terrestres y cultivos acuáticos criados para la producción de energía. Ejemplos de sustratos de biomasa incluyen, pero no se limitan a, madera, pulpa de madera, pasta de papel, fibra de maíz, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cultivos, tales como hojas de maíz, forraje de maíz, pastos, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, arroz, paja de arroz, pasto aguja, residuos de papel, papel y residuos procesadores de pasta, plantas leñosas o herbáceas, fruta o verdura de la pulpa, destiladores de granos, hierbas, cáscaras de arroz, algodón, cáñamo, lino, sisal, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, pasto aguja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, serrín, arbustos y matas, verduras, frutas y flores y las mezclas adecuadas de los mismos. En algunas formas de realización, la biomasa comprende, pero no se limita a los cultivos (por ejemplo, hierbas, incluyendo hierbas C4, tales como pasto aguja, hierba espinal, hierba de centeno, miscanthus, hierba cinta, o cualquier combinación de los mismos), residuos de tratamiento de azúcar, por ejemplo, pero no limitado a, bagazo (por ejemplo, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha [por ejemplo, remolacha azucarera], o una combinación de los mismos), residuos agrícolas (por ejemplo, soja Stover, rastrojo de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, paja, arroz, cáscaras de arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de trigo, paja de canola, paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, cáñamo, lino, sisal, algodón, o cualquier combinación de los mismos), pulpa de fruta de caña de azúcar, pulpa vegetal, granos de destilería, biomasa forestal (por ejemplo, madera, pasta de madera, pasta de papel, fibra de pulpa de madera reciclada, serrín, madera dura, como la madera de álamo, madera blanda, o una combinación de los mismos). Además, en algunas formas de realización, la biomasa comprende material de desecho celulósico y/o materiales de residuos forestales, incluyendo, pero no limitado a, papel y residuos de procesamiento de la pulpa, el desperdicio de papel municipal, papel de periódico, cartón y similares. En algunas formas de realización, la biomasa comprende una especie de fibra, mientras que en algunas realizaciones alternativas, la biomasa comprende una mezcla de fibras que se originan a partir de diferentes biomásas. En algunas realizaciones, la biomasa también comprende plantas transgénicas que expresan enzimas de ligninasa y/o celulasa (véase, por ejemplo, US 2008/0104724 A1).

[0190] Como se usa en este documento, "lignocelulosa" se refiere a una matriz de celulosa, hemicelulosa y lignina. La producción económica de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica típicamente implica la conversión de los componentes de celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables, típicamente monosacáridos tales como

glucosa (de la celulosa) y xilosa y arabinosa (de las hemicelulosas). Casi la conversión completa se puede lograr mediante un tratamiento previo químico de la lignocelulosa, seguido de hidrólisis enzimática con enzimas de celulasa. La etapa de pretratamiento químico hace que la celulosa sea más susceptible a la hidrólisis enzimática y, en algunos casos, también hidroliza el componente de hemicelulosa. Numerosos procesos de pretratamiento químicos son conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan al tratamiento previo ácido suave a altas temperaturas y el ácido, el tratamiento previo de amonio o extracción con disolvente orgánico diluido.

[0191] La lignina es un biopolímero más complejo y heterogéneo que celulosa o hemicelulosa y comprende una variedad de subunidades fenólicas. Despolimerización de lignina enzimática se puede lograr mediante peroxidasas de lignina, peroxidasa de manganeso, lacasas y deshidrogenasas de celobiosa (CDH), trabajando a menudo en sinergia. Sin embargo, como su nombre indica, las enzimas CDH también oxidan celobiosa a celobionolactona. Varios informes indican que la oxidación de celobiosa por CDH mejora la tasa de hidrólisis de la celulosa por celulasas en virtud de la reducción de las concentraciones de celobiosa, que es un potente inhibidor de algunos componentes de celulasa (Mansfield et al., Appl. Environ. Microbiol., 63: 3804-3809 [1997]; y Igarashi et al, Eur J. Biochem, 253: 101-106 [1998]). Recientemente, se ha informado de que CDHs puede mejorar la actividad de proteínas de mejora celulolítica de la familia de hidrolasa de glicosilo 61 (véase, por ejemplo, WO2010/080532A1).

[0192] Tal como se utiliza aquí, el término "biomasa lignocelulósica" se refiere a cualquier tipo de biomasa vegetal que comprende celulosa y hemicelulosa, unida a lignina.

[0193] En algunas realizaciones, la biomasa se pretrata opcionalmente para aumentar la susceptibilidad de celulosa a la hidrólisis por tratamientos previos químicos, físicos y biológicos (como la explosión de vapor, la fabricación de pasta, la trituración, la hidrólisis ácida, la exposición a disolventes, y similares, así como combinaciones de los mismos). Varias materias primas lignocelulósicas utilizan, incluyendo las que comprenden la materia prima lignocelulósica fresca, materia prima lignocelulósica parcialmente seca, materia prima lignocelulósica totalmente seca, y/o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las materias primas lignocelulósicas comprenden celulosa en una cantidad mayor que aproximadamente 20%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 30%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 40% (en peso). Por ejemplo, en algunas formas de realización, el material lignocelulósico comprende de aproximadamente 20% a aproximadamente 90% (en peso) de celulosa, o cualquier cantidad entre ellas, aunque en algunas formas de realización, el material lignocelulósico comprende menos de aproximadamente 19%, menos de aproximadamente 18%, menos de aproximadamente 17%, menos de aproximadamente 16%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 14%, menos de aproximadamente 13%, menos de aproximadamente 12%, menos de aproximadamente 11%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, o menos de aproximadamente 5% de celulosa (en peso). Además, en algunas formas de realización, la materia prima lignocelulósica comprende lignina en una cantidad mayor que aproximadamente 10%, más típicamente en una cantidad mayor que aproximadamente 15% (en peso). En algunas realizaciones, la materia prima lignocelulósica comprende pequeñas cantidades de sacarosa, fructosa y/o almidón. La materia prima lignocelulósica es generalmente sometida primero a la reducción de tamaño por métodos que incluyen, pero sin limitarse a, molienda, trituración, agitación, trituración, compresión/expansión u otros tipos de acción mecánica. La reducción de tamaño por la acción mecánica puede ser realizada por cualquier tipo de equipo adaptado para el propósito, por ejemplo, pero no limitado a, molinos de martillos, trituradoras de tolva, prensas de rodillos, refinadores y hidradespulpadoras. En algunas realizaciones, al menos 90% en peso de las partículas producidas a partir de la reducción de tamaño, tienen longitudes de menos de entre aproximadamente 1/16 y aproximadamente 4 pulgadas (la medición puede ser un volumen o una longitud media de peso). En algunas realizaciones, el equipo utilizado para reducir el tamaño de partícula es un molino de martillo o trituradora. Después de la reducción de tamaño, materia prima se suele suspender en agua, ya que esto facilita el bombeo del material de alimentación. En algunas realizaciones, materias primas lignocelulósicas de tamaño de partícula de menos de aproximadamente 6 pulgadas no requieren reducción de tamaño.

[0194] Tal como se utiliza aquí, el término "materia prima lignocelulósica" se refiere a cualquier tipo de biomasa lignocelulósica que es adecuado para uso como materia prima en las reacciones de sacarificación.

[0195] Tal como se utiliza aquí, el término "materia prima lignocelulósica tratada previamente," se refiere a materias primas lignocelulósicas que han sido sometidas a procesos físicos y/o químicos para hacer que la fibra sea más accesible y/o receptiva a las acciones de enzimas celulolíticas, como se describe anteriormente.

[0196] Tal como se usa en el presente documento, los términos "lignocelulosa competente", "utilización de lignocelulosa" y términos similares se refieren a un organismo que segrega enzimas que participan en la degradación de la lignina y la hidrólisis. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células fúngicas de lignocelulosa competentes secretan una o más peroxidasas de lignina, peroxidasa de manganeso, lacasas y/o deshidrogenasas de celobiosa (CDH). Estas enzimas extracelulares, esenciales para la degradación de la lignina, se refieren a menudo como "enzimas modificadoras de lignina" o "LME."

[0197] Un sustrato de biomasa se dice que está "pretratado" cuando ha sido procesado por algunos medios físicos y/o químicos para facilitar la sacarificación. Como se describe adicionalmente en este documento, en algunas

realizaciones, el sustrato de la biomasa es "pretratado," o tratado usando métodos conocidos en la técnica, tales como pretratamiento químico (por ejemplo, el tratamiento previo de amoníaco, el tratamiento previo con ácido diluido, tratamiento previo con alcalino diluido, o la exposición a disolventes), el tratamiento previo físico (por ejemplo, explosión de vapor o irradiación), el tratamiento previo mecánico (por ejemplo, trituración o molienda) y el tratamiento previo biológico (por ejemplo, la aplicación de microorganismos de solución de lignina) y combinaciones de los mismos, para aumentar la susceptibilidad de celulosa a la hidrólisis.

[0198] En algunas realizaciones, el sustrato se suspende antes de tratamiento previo. En algunas realizaciones, la consistencia de la suspensión es de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 30% y más típicamente entre aproximadamente 4% y aproximadamente 15%. En algunas formas de realización, la suspensión se somete a un agua y/o la operación de remojo ácido antes de tratamiento previo. En algunas formas de realización, la suspensión se deshidrata usando cualquier método adecuado para reducir el vapor de agua y uso de productos químicos antes de tratamiento previo. Ejemplos de dispositivos de deshidratación incluyen, pero no se limitan a prensas de tornillo a presión (Véase, por ejemplo, el documento WO 2010/022511), filtros presurizados y extrusoras.

[0199] En algunas realizaciones, el tratamiento previo se lleva a cabo para hidrolizar hemicelulosa, y/o una parte del mismo presente en lignocelulosa a azúcares de pentosa y hexosa monoméricos (por ejemplo, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, y/o cualquier combinación de los mismos). En algunas realizaciones, el tratamiento previo se lleva a cabo de manera que se produzca la hidrólisis casi completa de la hemicelulosa y se produce una pequeña cantidad de conversión de celulosa en glucosa. En algunas realizaciones, una concentración de ácido en la suspensión acuosa de aproximadamente 0,02% (en peso) a alrededor de 2% (en peso), o cualquier cantidad entre ellas, se utiliza normalmente para el tratamiento del sustrato celulósico. Cualquier ácido adecuado encuentra uso en estos métodos, incluyendo, pero no limitado a, ácido clorhídrico, ácido nítrico, y/o ácido sulfúrico. En algunas realizaciones, el ácido utilizado durante el tratamiento previo es el ácido sulfúrico. La explosión de vapor es un método de llevar a cabo el tratamiento previo de ácido de sustratos de biomasa (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 4.461.648). Otro método de tratamiento previo de la suspensión implica el tratamiento previo continuo (es decir, la biomasa celulósica se bombea a través de un reactor de forma continua). Estos métodos son bien conocidos para los expertos en la técnica (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 7.754.457).

[0200] En algunas realizaciones, el álcali se utiliza en el tratamiento previo. En contraste con tratamiento previo con ácido, el tratamiento previo con álcali puede no hidrolizar el componente de hemicelulosa de la biomasa. Más bien, el álcali reacciona con los grupos ácidos presentes en la hemicelulosa para abrir la superficie del sustrato. En algunas realizaciones, la adición de álcali altera la estructura cristalina de la celulosa de manera que sea más susceptible a la hidrólisis. Ejemplos de álcali que encuentran uso en el tratamiento previo incluyen, pero no se limitan a amoníaco, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, e hidróxido de sodio. Un método de tratamiento previo alcalino es la Explosión de Congelación de Amoníaco, Explosión de Fibra de Amoníaco o de Expansión de Fibra de Amoníaco (proceso "AFEX"; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.171.592; 5.037.663; 4.600.590; 6.106.888; 4.356.196; 5.939.544; 6.176.176; 5.037.663; y 5.171.592). Durante este proceso, el sustrato celulósico se pone en contacto con amoníaco o hidróxido de amonio en un recipiente a presión durante un tiempo suficiente para que el amonio o hidróxido de amonio altere la estructura cristalina de las fibras de celulosa. La presión a continuación se reduce rápidamente, lo que permite que el amoníaco pueda proyectar o hervir y explotar la estructura de fibras de celulosa. En algunas realizaciones, el amoníaco proyectado se recupera a continuación, utilizando métodos conocidos en la técnica. En algunos métodos alternativos, se utiliza tratamiento previo de amoníaco diluido. El método de tratamiento previo de amoníaco diluido utiliza más soluciones diluidas de amoníaco o hidróxido de amonio que AFEX (véase, por ejemplo, WO 2009/045651 y US 2007/0031953). Este proceso de tratamiento previo puede o puede no producir monosacáridos.

[0201] Un proceso de tratamiento previo adicional para su uso en la presente descripción incluye tratamiento químico del sustrato celulósico con disolventes orgánicos, en métodos tales como los que utilizan líquidos orgánicos en los sistemas de tratamiento previo (véase por ejemplo, patente de EE.UU. n° 4.556.430). Estos métodos tienen la ventaja de que los líquidos de bajo punto de ebullición pueden ser fácilmente recuperados y reutilizados. Otros tratamientos previos, como por ejemplo el proceso de OrganosolvTM, también utilizan líquidos orgánicos (véase por ejemplo, patente de EE.UU. n° 7.465.791). La sujeción del sustrato a agua a presión también puede ser un método de tratamiento previo adecuado (véase, por ejemplo, Weil et al, Appl Biochem Biotechnol., 68: 21-40 [1997]). En algunas realizaciones, la biomasa celulósica pretratada se procesa después del tratamiento previo por cualquiera de varios pasos, tales como dilución con agua, lavado con agua, zonas de separación, filtración o centrifugación, o cualquier combinación de estos procesos, antes de la hidrólisis enzimática, como sabrán expertos en la técnica.

[0202] El tratamiento previo produce una composición de materia prima pretratada (por ejemplo, una "suspensión de materia prima pretratada") que contiene un componente soluble incluyendo los azúcares resultantes de la hidrólisis de la hemicelulosa, opcionalmente ácido acético y otros inhibidores, y sólidos incluyendo materia prima no hidrolizada y lignina. En algunas realizaciones, los componentes solubles de la composición de materia prima pretratada se separan de los sólidos para producir una fracción soluble. En algunas formas de realización, la fracción soluble, incluyendo los azúcares liberados durante el tratamiento previo y otros componentes solubles (por ejemplo, inhibidores), se envía después a la fermentación. Sin embargo, en algunas formas de realización en la que la hemicelulosa no se hidroliza con eficacia durante el tratamiento previo de uno o más pasos adicionales se incluyen

(por ejemplo, un paso más allá de hidrólisis y/o la etapa de tratamiento enzimático y/o más alcalino y/o tratamiento con ácido) para producir azúcares fermentables. En algunas formas de realización, la separación se lleva a cabo mediante lavado de la composición de materia prima pretratada con una solución acuosa para producir una corriente de lavado y una corriente de sólidos que comprende materia prima pretratada no hidrolizada. Alternativamente, el componente soluble se separa de los sólidos mediante el sometimiento de la composición de materia prima pretratada a una separación de sólidos-líquidos, utilizando cualquier método adecuado (por ejemplo, centrifugación, microfiltración, la placa y el marco de filtración, filtración de flujo cruzado, filtración a presión, filtración a vacío, etc.). Opcionalmente, en algunas realizaciones, una etapa de lavado se incorpora en la separación de sólidos-líquidos. En algunas realizaciones, los sólidos separados que contienen celulosa, a continuación, se someten a hidrólisis enzimática con enzimas de celulasa para convertir la celulosa en glucosa. En algunas realizaciones, la composición de materia prima pretratada se alimenta en el proceso de fermentación sin separación de los sólidos contenidos en el mismo. En algunas realizaciones, los sólidos no hidrolizados se sometieron a hidrólisis enzimática con enzimas de celulasa para convertir la celulosa en glucosa después del proceso de fermentación. En algunas formas de realización, la materia prima celulósica pretratada se somete a hidrólisis enzimática con enzimas de celulasa.

[0203] Tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento químico" se refiere a cualquier tratamiento previo químico que promueve la separación y/o liberación de la celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

[0204] Tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento previo físico" se refiere a cualquier tratamiento previo que promueve la separación y/o liberación de la celulosa, hemicelulosa y/o lignina a partir de material celulósico.

[0205] Tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento previo mecánico" se refiere a cualquier medio mecánico para el tratamiento de biomasa, incluyendo pero no limitado a varios tipos de molienda o trituración (por ejemplo, molienda en seco, la molienda en húmedo, o un molino de bolas vibratorio).

[0206] Tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento previo biológico" se refiere a cualquier tratamiento previo biológico que promueve la separación y/o liberación de la celulosa, hemicelulosa y/o lignina a partir de material celulósico.

[0207] Tal como se utiliza aquí, el término "recuperado" se refiere a la recolección, aislamiento, recogida, o la recuperación de proteína a partir de una célula y/o medio de cultivo. En el contexto de la sacarificación, se utiliza en referencia a la recolección de azúcares fermentables producidos durante la reacción de sacarificación del medio de cultivo y/o células. En el contexto de la fermentación, se utiliza en referencia a la recolección del producto de fermentación del medio de cultivo y/o células. Por lo tanto, un proceso puede decirse que comprende "recuperación" de un producto de una reacción (tal como un azúcar soluble recuperado de sacarificación) si el proceso incluye la separación del producto de otros componentes de una mezcla de reacción posterior a al menos una parte del producto siendo generado en la reacción.

[0208] Tal como se usa en el presente documento, "aumentar" el rendimiento de un producto (tal como un azúcar fermentable) a partir de una reacción se produce cuando está presente durante la reacción de un componente particular de interés (por ejemplo, enzima) lleva a que más producto se produzca, en comparación con una reacción llevada a cabo bajo las mismas condiciones con el mismo sustrato y otros sustituyentes, pero en ausencia del componente de interés (por ejemplo, sin enzima).

[0209] Tal como se usa en el presente documento, se dice que una reacción es "sustancialmente libre" de una enzima particular, si la cantidad de aquella enzima en comparación con otras enzimas que participan en la catálisis de la reacción es menos de aproximadamente 2%, aproximadamente 1%, o aproximadamente 0,1% (peso/peso).

[0210] Como se usa en este documento, el "fraccionamiento" de un líquido (por ejemplo, un caldo de cultivo) significa la aplicación de un proceso de separación (por ejemplo, precipitación de sal, cromatografía en columna, exclusión por tamaño, y filtración) o una combinación de tales procedimientos para proporcionar una solución en que una proteína deseada (por ejemplo, una enzima celulasa, y/o una combinación de los mismos) comprende un mayor porcentaje de proteína total en la solución que en el producto líquido inicial.

[0211] Tal como se utiliza aquí, el término "hidrólisis enzimática," se refiere a la hidrólisis de un sustrato por una enzima. En algunas realizaciones, la hidrólisis comprende métodos en los que se pone en contacto al menos una enzima con al menos un sustrato para producir un producto final. En algunas realizaciones, los métodos de hidrólisis enzimáticas comprenden al menos una celulasa y al menos una enzima de glicosidasa y/o una mezcla de glicosidasas que actúan sobre polisacáridos, (por ejemplo, celulosa), para convertir la totalidad o una parte del mismo en azúcares fermentables. "Hidrolizar" y/o "hidrólisis" de celulosa u otro polisacárido se produce cuando al menos algunos de los enlaces glicosídicos entre dos monosacáridos presentes en el sustrato se hidrolizan, separándose de esta forma el uno del otro los dos monómeros que fueron unidos anteriormente.

[0212] Se pretende que la hidrólisis enzimática se lleva a cabo con cualquier tipo adecuado de enzima capaz de hidrolizar al menos un sustrato a al menos un producto final. En algunas realizaciones, el sustrato es celulosa, mientras que en algunas otras realizaciones, son lignocelulosas, y aún en otras formas de realización, es otra

composición (por ejemplo, almidón). En algunas realizaciones, el producto final comprende al menos un azúcar fermentable. Se pretende, además, que la hidrólisis enzimática abarque procesos llevados a cabo con cualquier tipo adecuado de enzimas celulasas capaces de hidrolizar la celulosa en glucosa, independientemente de su fuente. Se pretende que cualquier fuente adecuada de enzima encontrará uso en la presente invención, incluyendo pero no limitado a las enzimas obtenidas a partir de hongos, tales como *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Hypocrea* spp., *Humicola* spp., *Neurospora* spp., *Orpinomyces* spp., *Gibberella* spp., *Emericella* spp., *Chaetomium* spp., *Chrysosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Magnaporthe* spp., *Phanerochaete* spp., *Trametes* spp., *Lentinula edodes*, *Gleophyllum trabeiu*, *Ophiostoma piliferum*, *cinereus Corpinus*, *Geomyces pannorum*, *Cryptococcus laurentii*, *Aureobasidium pullulans*, *Amorphotheca resinae*, *Leucosporidium scotti*, *Cunninghamella elegans*, *Thermomyces lanuginosus*, *Myceliophthora thermophila*, y termófilo *Sporotrichum*, así como los obtenidos a partir de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Thermomyces*, *Clostridium*, *Streptomyces* y *Thermobifida*.

[0213] En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a un pH y temperatura que se encuentra en o cerca del óptimo para las enzimas de celulasa que se utilizan. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a aproximadamente 30°C a aproximadamente 75°C, o cualquier temperatura adecuada entremedia, por ejemplo una temperatura de aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, o cualquier temperatura entremedia, y un pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,5, o cualquier pH entremedio (por ejemplo, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, o cualquier pH entremedio adecuado). En algunas realizaciones, la concentración inicial de la celulosa, antes del inicio de la hidrólisis enzimática, es preferiblemente de aproximadamente 0,1% (en peso) a alrededor de 20% (en peso), o cualquier cantidad adecuada entre los mismos (por ejemplo, aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 4%, aproximadamente 6%, aproximadamente 8%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 18%, aproximadamente 20%, o cualquier cantidad adecuada entremedia). En algunas realizaciones, la dosis combinada de todas las enzimas de celulasa es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa, o cualquier cantidad adecuada entre los mismos (por ejemplo, aproximadamente 0,001, aproximadamente 0,01, aproximadamente 0,1, aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa o cualquier cantidad entremedia). La hidrólisis enzimática se lleva a cabo para cualquier periodo de tiempo adecuado. En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 200 horas, o en cualquier momento entremedio (por ejemplo, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 100 horas, o cualquier tiempo adecuado entremedio). Por ejemplo, en algunas formas de realización, se lleva a cabo por aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 7, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 120, aproximadamente 140, aproximadamente 160, aproximadamente 180, aproximadamente 200, o en cualquier momento adecuado entremedio.

[0214] En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática es la hidrólisis por lotes, la hidrólisis continua, y/o una combinación de las mismas. En algunas formas de realización, la hidrólisis se agita, sin mezclar, o una combinación de la misma. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo típicamente en un reactor de hidrólisis. La composición de enzima de celulasa se añade al sustrato lignocelulósico pretratado antes de, durante, o después de la adición del sustrato al reactor de hidrólisis. De hecho, no se pretende que las condiciones de reacción se limiten a las indicadas en el presente documento, como modificaciones que estén bien dentro del conocimiento de expertos en la técnica. En algunas formas de realización, después de la hidrólisis de celulosa, los sólidos insolubles presentes en el hidrolizado lignocelulósico resultante, incluyendo pero no limitado a la lignina, se eliminan usando técnicas de separación sólido-líquido convencionales antes de cualquier tratamiento posterior. En algunas realizaciones, estos sólidos se queman para proporcionar energía para todo el proceso.

[0215] Tal como se usa en el presente documento, la "celulosa total disponible" es la cantidad (% en peso) de la celulosa que se puede acceder a la hidrólisis enzimática. Celulosa total disponible es típicamente igual a, o muy cerca de ser igual a, la cantidad de celulosa presente inicial en una reacción de hidrólisis.

[0215] Tal como se usa en el presente documento, la "celulosa total disponible" es la cantidad (% en peso) de la celulosa que se puede acceder a la hidrólisis enzimática. La celulosa total disponible es típicamente igual a, o muy cerca de la cantidad de celulosa presente inicial en una reacción de hidrólisis.

[0216] Tal como se usa en el presente documento, la "celulosa residual" es la porción (% en peso) de la celulosa total disponible en la mezcla de hidrólisis que permanece sin hidrolizar. La celulosa residual se puede medir usando

cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede medir directamente usando espectroscopía de IR, o se puede medir mediante la determinación de la cantidad de glucosa generada por hidrólisis ácida concentrada de los sólidos residuales.

5 **[0217]** Tal como se usa en el presente documento, la "celulosa hidrolizada total" es la porción de la celulosa total disponible que se hidroliza en la mezcla de hidrólisis. Por ejemplo, la celulosa hidrolizada total puede calcularse como la diferencia entre la "celulosa total disponible" y la "celulosa residual."

10 **[0218]** Tal como se usa en el presente documento, el "rendimiento máximo teórico de glucosa" es la cantidad máxima (% en peso) de la glucosa que podría producirse bajo condiciones dadas de la celulosa total disponible.

15 **[0219]** Tal como se usa en este documento, "Gmax" se refiere a la cantidad máxima (% en peso) de glucosa que podría producirse a partir de la celulosa hidrolizada total. Gmax se puede calcular, por ejemplo, midiendo directamente la cantidad de celulosa residual que quede al final de una reacción bajo condiciones de reacción dadas, restando la cantidad de celulosa residual de la celulosa total disponible para determinar la celulosa hidrolizada total y calculando a continuación la cantidad de glucosa que podría producirse a partir de la celulosa hidrolizada total.

20 **[0220]** Se apreciará por los expertos en la técnica que cuando se calcula los valores teóricos tales como Gmax y el rendimiento de glucosa máxima teórica, la masa de dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno que se agregan a la molécula de glucosa en el curso de la reacción de hidrólisis se tienen en cuenta. Por ejemplo, cuando se hidroliza un polímero de unidades de glucosa "n", unidades de agua (n-1) se añaden a las moléculas de glucosa formadas en la hidrólisis, por lo que el peso de la glucosa producida es de aproximadamente 10% mayor que el peso de celulosa consumida en la hidrólisis (por ejemplo, la hidrólisis de 1 g de celulosa produciría sobre 1,1 g de glucosa).

25 **[0221]** Por lo tanto, como un ejemplo, donde 5 g de celulosa total disponible está presente en el inicio de una reacción de hidrólisis, y 2 g de celulosa residual que queda después de la reacción, la celulosa hidrolizada total es de 3 g de celulosa. Un rendimiento de glucosa máxima teórica de 100% (en peso) en las condiciones de reacción es de aproximadamente 5,5 g de glucosa. Gmax se calcula basándose en 3 g de celulosa que se liberó o convirtió en la reacción de hidrólisis. Por lo tanto, en este ejemplo, un Gmax de 100% (en peso) es de aproximadamente 3,3 g de glucosa. los niveles de celulosa, o bien la cantidad total disponible presente en el sustrato o la cantidad de celulosa hidrolizada o residual, se puede cuantificar mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como por espectroscopia de IR o mediante la medición de la cantidad de glucosa generada por hidrólisis ácida concentrada de la celulosa (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos nº 6.090.595 y 7.419.809).

30 **[0222]** Tal como se usa en el presente documento, el término "sólidos no disueltos" se refiere a material sólido que está suspendido, pero no disuelto, en un líquido. Como es bien conocido en la técnica, la concentración de sólidos suspendidos o disueltos se puede determinar por cualquier método adecuado (por ejemplo, mediante la filtración de una muestra de la suspensión utilizando papel de filtro de microfibras de vidrio, lavando la torta de filtración con agua, y secando la torta durante la noche a aproximadamente 105°C).

35 **[0223]** Tal como se utiliza aquí, los términos "sólidos no hidrolizados", "sólidos no convertidos," y similares se refieren a la celulosa que no se digiere por la enzima de celulasa, así como materiales no celulósicos, o de otro tipo, que son inertes a la enzima de celulasa, presentes en el material de alimentación.

40 **[0224]** Tal como se utiliza aquí, el término "subproducto" se refiere a una molécula orgánica que es un producto no deseado de un proceso en particular (por ejemplo, la sacarificación).

45 **[0225]** Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpos" se refiere a inmunoglobulinas. Los anticuerpos incluyen pero no se limitan a las inmunoglobulinas obtenidas directamente de cualquier especie de la que es deseable obtener anticuerpos. Además, la presente invención abarca anticuerpos modificados. El término también se refiere a fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse al epítipo al que se une el anticuerpo intacto e incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotipos (anti-Id). Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), las regiones de los fragmentos variables de cadena única (scFv), región de cadena pesada variable (VH) y los fragmentos de cadena ligera de la región variable (VL).

50 **[0226]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "térmicamente estable" y "termoestable" se refieren a las enzimas de la presente invención que retienen una cantidad especificada de la actividad enzimática después de la exposición a temperaturas identificadas durante un período determinado de tiempo en condiciones que prevalecen durante el uso de la enzima, por ejemplo, cuando se expone a temperaturas alteradas. "La alteración de las temperaturas" incluyen el aumento o disminución de las temperaturas. En algunas realizaciones, las enzimas retienen al menos aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 92%, aproximadamente

95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% la actividad enzimática después de la exposición a temperaturas alteradas durante un período de tiempo dado, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 240 minutos, aproximadamente 300 minutos, etc.

[0227] Tal como se utiliza aquí, el término "hongo termófilo" se refiere a cualquier hongo que exhibe un crecimiento óptimo a una temperatura de al menos aproximadamente 37°C, y generalmente por debajo de aproximadamente 100°C, como por ejemplo entre aproximadamente 37°C a aproximadamente 80°C, entre aproximadamente 37°C a aproximadamente 75°C, entre aproximadamente 40°C a aproximadamente 65°C, o entre aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C. Típicamente, el crecimiento óptimo se exhibe a una temperatura de al menos aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C.

[0228] En la presente memoria, "disolvente estable" se refiere a un polipéptido que mantiene la actividad similar (más de por ejemplo, aproximadamente 60% a aproximadamente 80%) después de la exposición a concentraciones variables (por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 99%) de un disolvente no acuoso (por ejemplo, alcohol isopropílico, tetrahidrofurano, 2-metiltetrahidrofurano, acetona, tolueno, acetato de butilo, metilo terc-éter de butilo, etc.) durante un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 24 horas) en comparación con un polipéptido de referencia .

[0229] Tal como se utiliza aquí, el término "oxidación estable" se refiere a las enzimas de la presente invención que retienen una cantidad especificada de la actividad enzimática durante un período determinado de tiempo en condiciones que prevalecen durante el uso de la invención, por ejemplo, mientras que estén expuestas o puestas en contacto con agentes oxidantes. En algunas realizaciones, las enzimas retienen al menos aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 92%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% de actividad enzimática después del contacto con un agente oxidante en un período de tiempo determinado, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 8 minutos, aproximadamente 12 minutos, aproximadamente 16 minutos, aproximadamente 20 minutos, etc.

[0230] Tal como se usa en el presente documento, "pH estable" se refiere a un polipéptido que mantiene la actividad similar (más de por ejemplo, aproximadamente 60% a aproximadamente 80%) después de la exposición a pH bajo o alto (por ejemplo, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6 o aproximadamente 8 a aproximadamente 12) por un período de tiempo (por ejemplo, 0,5-24 horas) en comparación con un polipéptido de referencia.

[0231] Tal como se utiliza aquí, el término "estabilidad mejorada" en el contexto de una oxidación, quelante, enzima estable térmica y/o pH se refiere a una actividad enzimática más alta conservada con el tiempo en comparación con otras enzimas y/o enzimas de tipo silvestre.

[0232] Tal como se utiliza aquí, el término "disminución de la estabilidad" en el contexto de una oxidación, quelante, enzima térmica y/o pH estable se refiere a una actividad enzimática retenida inferior con el tiempo en comparación con otras enzimas y/o enzimas de tipo silvestre .

Descripción detallada

[0233] La presente descripción proporciona mejores cepas de hongos. En algunas realizaciones, la mejora de la cepa fúngica encuentra uso en la hidrólisis de material celulósico a glucosa. Como se indica en el presente documento, la presente descripción proporciona cepas de hongos que han reducido la actividad secretada de una deshidrogenasa celobiosa endógena. En algunas realizaciones de la descripción, las cepas de hongos secretan mezclas de enzimas que mejoran el rendimiento de azúcares fermentables a partir de celulosa. Los informes anteriores han indicado que la oxidación de deshidrogenasa celobiosa por celobiosa mejora la tasa de hidrólisis de la celulosa por celulasas. En contraste con el pensamiento tradicional en la técnica, la presente invención sorprendentemente proporciona modificaciones genómicas que reducen la actividad deshidrogenasa celobiosa y dan lugar a la mejora en el rendimiento de azúcares fermentables a partir de celulosa. Ventajosamente, las células fúngicas de celulasas productoras modificadas genéticamente descritas aquí secretan mezclas de enzima que resultan en la mejora de los rendimientos de azúcares fermentables como la glucosa a partir de celulosa.

[0234] La lignocelulosa (también "biomasa lignocelulósica") comprende una matriz de celulosa, hemicelulosa y lignina. La producción económica de biocombustibles a partir de biomasa de lignocelulósica típicamente implica la conversión de los componentes de celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables, típicamente monosacáridos tales como glucosa (de la celulosa) y xilosa y arabinosa (de las hemicelulosas). La conversión casi completa se puede lograr mediante un tratamiento previo químico de la lignocelulosa, seguido de hidrólisis enzimática con enzimas de celulasas. La etapa de tratamiento previo químico hace que la celulosa sea más susceptible a la hidrólisis enzimática y, en algunos casos, también hidroliza el componente de hemicelulosa. Numerosos procesos de tratamiento previo químicos conocidos en la técnica se utilizan en la presente invención, e incluyen, pero no se limitan al tratamiento previo de ácido suave a altas temperaturas y el ácido diluido, el tratamiento previo de amonio

y/o extracción con disolvente orgánico.

[0235] La celulasa es típicamente una mezcla de diferentes tipos de enzimas celolíticas (por ejemplo, endoglucanasas y celobiohidrolasas, estas últimas también se conocen como "exoglucanasas") que actúan de forma sinérgica para descomponer la celulosa a di- o oligosacáridos solubles tales como celobiosa, que después se hidroliza adicionalmente a la glucosa por la beta-glucosidasa. Las enzimas celulasas son producidas por una amplia variedad de microorganismos. Las celulasas, así como hemicelulasas de hongos filamentosos y algunas bacterias son ampliamente explotados para muchas aplicaciones industriales que implican el procesamiento de fibras naturales a los azúcares.

[0236] La lignina es un biopolímero más complejo y heterogéneo que cualquiera de celulosa o hemicelulosa y comprende una variedad de subunidades fenólicas. La despolimerización enzimática de la lignina se puede lograr mediante peroxidadas de lignina, peroxidasa de manganeso, lacasas, y/o deshidrogenasas de celobiosa (CDH), trabajando a menudo en sinergia. Sin embargo, como su nombre indica, las enzimas CDH también oxidan celobiosa a celobionolactona. Varios informes indican que la oxidación de celobiosa por CDH mejora la tasa de hidrólisis de la celulosa por celulasas en virtud de la reducción de las concentraciones de celobiosa, que es un potente inhibidor de algunos componentes de celulasa (Véase, por ejemplo, Mansfield et al., Appl. Environ. Microbiol., 63: 3.804 a 3.809 [1997]; y Igarashi et al., Eur J. Biochem, 253: 101-106 [1998]). Recientemente, se ha informado de que CDHs pueden mejorar la actividad de proteínas de mejora celolítica de la familia de hidrolasa de glicosilo 61 (véase, por ejemplo, WO2010/080532A1).

[0237] Entre los hongos filamentosos productores de celulasa, se encuentran también aquellos que producen una variedad de enzimas implicadas en la degradación de la lignina. Por ejemplo, los organismos de los géneros tales como *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Sporotrichum*, *Thielavia*, *Phanerochaete* y *Trametes* producen y secretan una mezcla de enzimas degradantes de celulasas, hemicelulasas y lignina. Estos tipos de organismos se llaman comúnmente "hongos de pudrición blanca" en virtud de su capacidad para digerir la lignina y para distinguirlos de los hongos "de pudrición roja" (por ejemplo, *Trichoderma*), que normalmente no pueden digerir la lignina.

Células fúngicas genéticamente modificadas

[0238] Las células fúngicas modificadas genéticamente descritas en este documento permiten una reducción en la cantidad de actividad de la deshidrogenasa de celobiosa endógena que es secretada por la célula. En algunas células fúngicas modificadas genéticamente descritas en este documento, la actividad deshidrogenasa celobiosa secretada por la célula se reduce en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, sobre 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más, en relación con el nivel de actividad de la deshidrogenasa celobiosa secretada por la célula fúngica parental no modificada producida o cultivada esencialmente en las mismas condiciones de cultivo. La célula fúngica modificada genéticamente puede proporcionar al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más, en relación con el nivel de actividad de la deshidrogenasa celobiosa secretada por la célula fúngica parental no modificada crecida o cultivada bajo esencialmente las mismas condiciones.

[0239] Se apreciará fácilmente que cualquier modificación genética adecuada conocida en la técnica puede emplearse para reducir la actividad secretada de la deshidrogenasa celobiosa endógena. Por ejemplo, como se describe a continuación, las modificaciones contempladas en este documento incluyen modificaciones que reducen la cantidad de deshidrogenasa celobiosa secretada por la célula. También se contemplan modificaciones que reducen la cantidad de deshidrogenasa celobiosa expresada por la célula. Formas de realización adicional incluyen modificaciones que reducen el nivel de transcripción de deshidrogenasa celobiosa. Otras realizaciones adicionales incluyen la delección total o parcial de una deshidrogenasa celobiosa codificador de genes. Otras realizaciones incluyen modificaciones que reducen la eficiencia catalítica de deshidrogenasa celobiosa.

[0240] Enzimas secretadas. En algunas realizaciones, las células fúngicas se han modificado genéticamente para reducir la cantidad de la deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula. Una reducción en la cantidad de deshidrogenasa celobiosa secretada puede ser una reducción completa o parcial de la deshidrogenasa celobiosa secretada al medio extracelular. La reducción de la cantidad de deshidrogenasa celobiosa secretada se puede lograr mediante la reducción de la cantidad de deshidrogenasa celobiosa producida por la célula y/o mediante la reducción de la capacidad de la célula para secretar la deshidrogenasa celobiosa producida por la célula. Los métodos para la

reducción de la capacidad de la célula para secretar un polipéptido se pueden realizar de acuerdo con cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Fass y Engels J. Biol Chem., 271: 15244 a 15.252 [1996]). Por ejemplo, el gen que codifica un polipéptido secretado puede ser modificado para eliminar o inactivar un péptido señal de secreción. En algunas realizaciones, las células fúngicas se han modificado genéticamente para alterar el péptido señal de secreción N-terminal de la deshidrogenasa celobiosa. En algunas realizaciones, la cantidad de deshidrogenasa celobiosa secretada por la célula se reduce en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más, en relación con la secreción de deshidrogenasa celobiosa en un organismo sin modificar cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

[0241] Además, en algunas realizaciones, la cantidad total de actividad de la deshidrogenasa celobiosa se reduce en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más, respecto a la cantidad total de deshidrogenasa celobiosa secretada en un organismo no modificado crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

[0242] La disminución de la secreción de una deshidrogenasa celobiosa se puede determinar por cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica para la detección de los niveles de proteína o enzima. Por ejemplo, los niveles de deshidrogenasa celobiosa en el sobrenadante de un cultivo de hongos se pueden detectar usando técnicas de transferencia Western o cualesquiera otras técnicas de detección de proteínas adecuadas que utilizan un anticuerpo específico para la deshidrogenasa celobiosa. Del mismo modo, la actividad de deshidrogenasa celobiosa secretada en el sobrenadante de un cultivo de hongos puede medirse utilizando ensayos de actividad deshidrogenasa de celobiosa como se describe en mayor detalle en este documento.

[0243] Nivel de expresión. En algunas realizaciones, las células fúngicas se han modificado genéticamente para reducir la cantidad de la deshidrogenasa celobiosa endógena expresada por la célula. En la presente memoria, la expresión se refiere a la conversión de la información codificada en un gen para la proteína codificada por ese gen. Por lo tanto, una reducción de la cantidad de una deshidrogenasa celobiosa expresada representa una reducción en la cantidad de la deshidrogenasa celobiosa que finalmente se traduce por la célula. En algunas de tales realizaciones, la reducción en la expresión se lleva a cabo mediante la reducción de la cantidad de ARNm que se transcribe a partir de una deshidrogenasa celobiosa codificadora de genes. En algunas otras realizaciones, la reducción en la expresión se lleva a cabo mediante la reducción de la cantidad de proteína que se traduce a partir de una deshidrogenasa celobiosa codificadora de ARNm.

[0244] La cantidad de deshidrogenasa celobiosa expresada por la célula se puede reducir en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, sobre 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más, en relación a la expresión de deshidrogenasa celobiosa en una célula fúngica sin modificar. En algunas de tales realizaciones, la reducción en la expresión se lleva a cabo mediante la reducción de la cantidad de ARNm que se transcribe a partir de una deshidrogenasa celobiosa codificadora de genes en un organismo no modificado crecido o cultivado bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

[0245] Además, en algunas realizaciones, una reducción en el nivel de expresión de una deshidrogenasa de celobiosa resulta en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% de reducción en el nivel de expresión total de la actividad de deshidrogenasa celobiosa por la célula fúngica con relación a una célula no modificada de los hongos producidos o cultivados esencialmente en las mismas condiciones de cultivo.

[0246] La disminución de la expresión de una deshidrogenasa celobiosa puede determinarse mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica para la detección de los niveles de proteína o enzima. Por ejemplo, los niveles de deshidrogenasa celobiosa en el sobrenadante de un cultivo de hongos se pueden detectar usando técnicas de transferencia Western o cualesquiera otras técnicas de detección de proteínas adecuadas que utilizan un anticuerpo específico para la deshidrogenasa celobiosa.

[0247] Los métodos para reducir la expresión de un polipéptido son bien conocidos y se pueden realizar utilizando cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, el gen que codifica un polipéptido secretado puede ser modificado para interrumpir una secuencia de iniciación de la traducción tal como una secuencia Shine-Delgarno o una secuencia de consenso Kozak. Además, el gen que codifica un polipéptido secretado puede ser modificado para introducir una mutación de desplazamiento de marco en la transcripción que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. También se reconocerá que el uso de los codones poco comunes puede resultar en la reducción de expresión de un polipéptido. Se apreciará que en algunas realizaciones, el gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa tiene al menos una mutación sin sentido que da como resultado la traducción de una proteína truncada.

[0248] Otros métodos de reducción de la cantidad de polipéptido expresado incluyen metodologías de silenciamiento de ARN post-transcripcional como el ARN antisentido y la interferencia de ARN. Las técnicas antisentido son bien establecidas, e incluyen el uso de una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácido nucleico del gen. Más específicamente, la expresión del gen por una célula fúngica puede ser reducida o eliminada mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácido nucleico, que puede ser transcrito en la célula y es capaz de hibridar al ARNm producido en la célula. Bajo condiciones que permiten la secuencia de nucleótidos antisentido complementaria para hibridar al ARNm, la cantidad de proteína traducida se reduce o se elimina. Los métodos para expresar ARN antisentido se conocen en la técnica (Véase, por ejemplo, Ngiam et al, Appl Environ Microbiol, 66 (2): 775-82 [2000]; y Zrenner et al, Planta, 190 (2): 247-52 [1993]).

[0249] Por otra parte, la modificación, la regulación por disminución o la inactivación del gen puede obtenerse mediante técnicas de interferencia de ARN (RNAi) (Véase, por ejemplo, Kadotani et al Mol Plant Microbe Interact, 16: 769-76 [2003]). Metodologías de interferencia de ARN incluyen ARN bicatenario (ARNds), ARN de horquilla corta (ARNsh) y pequeños ARN de interferencia (siARNs). Silenciamiento potente usando ARNds se puede obtener usando cualquier técnica adecuada (véase por ejemplo, Fire et al., Nature 391.: 806-11 [1998]). Silenciamiento usando shARNs también está bien establecido (véase por ejemplo, Paddison et al, Genes Dev., 16.: 948-958 [2002]). El silenciamiento que utilizan técnicas de ARNsi también se conocen (Véase, por ejemplo, Miyagishi et al, Nat Biotechnol., 20: 497-500 [2002]).

[0250] Nivel de transcripción. En algunas realizaciones, las células fúngicas se han modificado genéticamente para reducir el nivel de transcripción de un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. En la presente memoria, la transcripción y términos similares se refieren a la conversión de la información codificada en un gen para un transcrito de ARN. De acuerdo con ello, una reducción del nivel de la transcripción de una deshidrogenasa celobiosa es una reducción en la cantidad de ARN transcrito de una codificación ARN para una deshidrogenasa celobiosa. En algunas realizaciones, el nivel de transcripción se reduce en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más, en relación con el nivel de transcripción de una deshidrogenasa celobiosa en un organismo sin modificar cultivados bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

[0251] Además, en algunas realizaciones, una reducción en el nivel de transcripción de una deshidrogenasa celobiosa que resultan en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35% , alrededor de 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente una reducción del 99% en la deshidrogenasa total de celobiosa secretada por la célula fúngica en relación con un organismo no modificado crecido o cultivado esencialmente en las mismas condiciones de cultivo. La disminución de la transcripción se puede determinar por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica para la detección de los niveles de transcripción. Por ejemplo, los niveles de transcripción de un ARNm particular en una célula de hongos se pueden detectar utilizando técnicas cuantitativas de RT-PCR u otras técnicas de detección de ARN que detectan específicamente un ARNm particular. Los métodos para reducir el nivel de transcripción de un gen se puede realizar según cualquier método adecuado conocido en la técnica, e incluyen la eliminación parcial o completa del gen, y la interrupción o la sustitución del promotor del gen de tal manera que la transcripción del gen se reduce considerablemente o incluso se inhibe. Por ejemplo, el promotor del gen puede ser

reemplazado con un promotor débil (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 6.933.133). Por lo tanto, donde el promotor débil se une operativamente a la secuencia codificante de un polipéptido endógeno, la transcripción de ese gen se reduce o se inhibe en gran medida.

5 **[0252] Delección de genes.** En algunas realizaciones, las células fúngicas se han modificado genéticamente para al menos parcialmente suprimir un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena. Típicamente, esta supresión reduce o elimina la cantidad total de deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula fúngica. En algunas realizaciones, se contempla la eliminación completa o casi completa de la secuencia del gen. Sin embargo, una mutación de delección no tiene que eliminar completamente toda la secuencia de gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa, con el fin de reducir la cantidad de deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula fúngica. Por ejemplo, en algunas formas de realización, hay una delección parcial que elimina uno o más nucleótidos que codifican un aminoácido en un sitio activo de deshidrogenasa celobiosa, que codifica una señal de secreción, o que codifica otra parte de la deshidrogenasa celobiosa que juega un papel en la actividad de deshidrogenasa celobiosa endógena que está siendo secretada por la célula fúngica.

15 **[0253]** Una delección en una deshidrogenasa celobiosa codificadora de genes de acuerdo con las formas de realización proporcionadas en este documento incluyen una delección de uno o más nucleótidos en el gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa. En algunas realizaciones, hay una delección de al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, alrededor de 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100%, del gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa, en el que se reduce la cantidad de deshidrogenasa celobiosa secretada por la célula.

20 **[0254]** Por lo tanto, en algunas realizaciones, los resultados de delección en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, alrededor de 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente un 99% de reducción en la actividad de la deshidrogenasa celobiosa secretada por la célula fúngica, en relación con la actividad de deshidrogenasa celobiosa secretada por un organismo no modificado producido o cultivado esencialmente en las mismas condiciones de cultivo.

30 **[0255]** Además, en algunas formas de realización, los resultados de delección en al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, alrededor de 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente una reducción del 99% en la deshidrogenasa total de celobiosa secretada por la célula fúngica con relación a una célula fúngica modificada crecida o cultivada bajo esencialmente las mismas condiciones de cultivo.

40 **[0256]** La supresión de un gen de deshidrogenasa celobiosa puede ser detectada y confirmada por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica para la detección de delecciones de genes, incluyendo los métodos que se prevén en el presente documento y en los Ejemplos. Por ejemplo, como se ejemplifica en el presente documento, la supresión de genes se puede confirmar mediante amplificación por PCR de la región genómica modificada. Se apreciará que técnicas adecuadas adicionales para la confirmación de la eliminación se pueden utilizar y son bien conocidas, incluyendo técnicas de transferencia Southern, secuenciación de ADN de la región genómica modificada, y la detección de marcadores positivos o negativos incorporados durante los eventos de recombinación.

50 **[0257]** Los métodos para la eliminación completa y/o parcial de un gen son bien conocidos y las células fúngicas modificadas genéticamente descritas en este documento pueden generarse utilizando cualquiera de una variedad de métodos de eliminación conocidos en la técnica que dan como resultado una reducción en la cantidad de deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por las células. Tales métodos pueden incluir ventajosamente la interrupción de genes estándar utilizando marcadores flanqueantes homólogos (Véase, por ejemplo, Rothstein, Meth Enzymol., 101: 202-211 [1983]). Otras técnicas para la supresión de genes incluyen métodos basados en PCR para la eliminación estándar (Véase, por ejemplo, Davidson et al, Microbiol. 148: 2607-2615 [2002]).

60 **[0258]** Técnicas de delección de genes adicionales incluyen casetes "positivos-negativos"; delección basada en

cre/lox, transformación biolística para aumentar la recombinación homóloga y la interrupción de genes mediada por *Agrobacterium*. El método "positivo-negativo" emplea casetes que consisten en un gen marcador para la selección positiva y otro gen marcador para la selección negativa (véase por ejemplo, Chang et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 84: 4959-4963 [1987]). metodologías basadas en Cre/lox emplean eliminación de genes marcadores utilizando la expresión de recombinasa Cre (véase, por ejemplo,, Florea et al, Fung Genet Biol., 46: 721-730 [2009]).

[0259] Los métodos para introducir ADN o ARN en células fúngicas son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a la transformación mediada por PEG de protoplastos, electroporación, transformación biolística, y transformación mediada por *Agrobacterium*. Transformación biolística emplea un proceso en el que se introduce el ADN o ARN en las células en las partículas de tamaño micrométrico, aumentando así la entrega de un constructo de delección a la célula fúngica (Véase, por ejemplo, Davidson et al., Fung. Genet. Biol., 29:38-48 [2000]). Del mismo modo, la transformación mediada por *Agrobacterium* junto con casetes de delección lineales o de marcadores divididos puede facilitar el suministro de construcciones de delección a la célula diana (Véase, por ejemplo, Wang et al, Curr Genet., 56: 297-307 [2010]).

[0260] Otros métodos para la delección del gen completo o parcial incluyen la interrupción del gen. Técnicas de tal interrupción de genes son conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitadas a la mutagénesis de inserción, el uso de transposones, e integración marcada. Sin embargo, se apreciará que cualquier técnica adecuada que permita la interrupción de la secuencia codificante o cualquier otro aspecto funcional de un gen encuentra uso en la generación de las células fúngicas modificadas genéticamente previstas en este documento. Los métodos de mutagénesis por inserción se pueden realizar de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica (Véase, por ejemplo, Combiar et al, FEMS Microbiol Lett, 220: 141-8 [2003]). Además, mutagénesis insercional mediada por *Agrobacterium* puede utilizarse para insertar una secuencia que interrumpe la función del gen codificado, tales como la interrupción de la secuencia de codificación o cualquier otro aspecto funcional del gen.

[0261] Metodologías de mutagénesis de transposon proporcionan otro medio para la interrupción del gene. Mutagénesis de Transposon es conocida en el arte y se puede realizar usando técnicas in vivo (véase por ejemplo, Firon et al., Eukaryot. Cell 2:247-55 [2003]); o por el uso de técnicas *in vitro* (véase por ejemplo, Adachi et el., Curr.) Genet., 42:123-7 [2002]). Por lo tanto, alteración de genes específicos mediante mutagénesis de transposon puede utilizarse para insertar una secuencia que interrumpe la función del gen codificado, tales como la interrupción de la secuencia de codificación o cualquier otro aspecto funcional del gen.

[0262] La integración mediada por enzima de restricción (REMI) es otra metodología para la interrupción del gen y es bien conocida en la técnica (véase por ejemplo, Thon et el., Mol.) (Plant Microbe Interact., 13:1356-65 [2000]). REMI genera inserciones en sitios de restricción genómica de una manera aparentemente aleatoria, algunos de los cuales causan mutaciones. Así, mutantes insercionales demuestran la interrupción del gen que codifica la deshidrogenasa de celobiosa endógena puede ser seleccionada y utilizada como se prevé.

[0263] Interrupción catalítica. En algunas otras realizaciones, la célula fúngica ha sido modificada genéticamente para reducir la eficacia catalítica de la deshidrogenasa de celobiosa. Una reducción en la eficacia catalítica se refiere a una reducción en la actividad de la deshidrogenasa de celobiosa, con respecto a la deshidrogenasa de celobiosa no modificada, medida usando las técnicas estándar, contenidas o conocidas en la técnica. Por lo tanto, una modificación genética que reduce la eficacia catalítica puede ocasionar, por ejemplo, en un producto de la proteína traducida que tiene una reducción en la actividad enzimática.

[0264] Una reducción en la eficacia catalítica es la reducción de la actividad de la deshidrogenasa de celobiosa de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96% , aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o más, en relación con la deshidrogenasa de celobiosa no modificada, medida usando las técnicas estándar. En algunas otras realizaciones, la modificación genética resulta en una reducción de la actividad de celobiosa deshidrogenasa de al menos aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94% , aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% en la actividad de la deshidrogenasa de celobiosa total secretada por la célula fúngica, en comparación con la deshidrogenasa de celobiosa no modificada, medida usando técnicas estándar.

[0265] Métodos para reducir la eficacia catalítica de deshidrogenasas son bien conocidos, y como tales, cualquiera de una variedad de métodos adecuados en la técnica para reducir eficacia catalítica encuentran uso en la modificación genética de células micóticas. Así, por ejemplo, la célula del hongo puede ser genéticamente

modificada para desactivar uno o más residuos en un sitio activo de la deshidrogenasa de celobiosa (véase por ejemplo, Frederik et al., *Biochem.*, 42:4049-4056 [2003]). Por ejemplo, se puede modificar uno o más residuos para disminuir el atascamiento del sustrato, o uno o más residuos pueden modificarse para disminuir la actividad catalítica de la deshidrogenasa de celobiosa. Por consiguiente, se puede realizar uno o más residuos en el dominio vinculante aceptador del electrón (e.g., flavina), o cualquier dominio de enlace de sustrato de la deshidrogenasa de celobiosa para reducir o desactivar la eficacia catalítica de la deshidrogenasa de celobiosa. Del mismo modo, será evidente que la mutación de los residuos fuera de un sitio activo puede resultar en cambios alostéricos en la forma o actividad de la deshidrogenasa de celobiosa, de tal manera que el eficiente catalítico de la enzima se reduce.

[0266] en algunas realizaciones, otros dominios son objeto de por lo menos una mutación que resulta en la reducción de la eficacia catalítica de la deshidrogenasa de celobiosa endógena. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una mutación de uno o más residuos en un dominio de unión hemos de la deshidrogenasa de celobiosa puede resultar en menor eficacia catalítica (Véase por ejemplo, Rotsaert et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 390:206-14 [2001]).

Células fúngicas

[0267] Tal como se indica en el presente documento, la presente divulgación prevé células fúngicas de la familia Chaetomiaceae que han sido genéticamente modificadas para reducir la cantidad de actividad de deshidrogenasa celobiosa endógena que es secretada por la célula, donde la célula fúngica es capaz de secreción de una mezcla de enzima que contiene celulasa. Los Chaetomiaceae son una familia de hongos en el Ascomycota, clase Sordariomycetes. La familia Chaetomiaceae incluye los géneros *Achaetomium*, *Aporothielavia*, *Chaetomidium*, *Chaetomium*, *Corylomyces*, *Corynascus*, *Farrowia*, *Thielavia*, *Zopfiella* y *Myceliophthora*. En algunas realizaciones, la célula de hongos modificada genéticamente contenida es miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* y *Chaetomium*.

[0268] en algunas realizaciones, la célula de hongos modificada genéticamente es un anamorfo o teleomorfo del miembro de familia Chaetomiaceae de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* y *Chaetomium*. En algunas realizaciones, se selecciona la célula fúngica genéticamente modificada de *Sporotrichum*, *Chrysosporium*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* y *Acremonium*. También se contempla que la célula fúngica modificada genéticamente también se puede seleccionar de los géneros *Ctenomyces*, *Thermoascus* y *Scytalidium*, incluyendo anamorfos y teleomorfos de células fúngicas de estos géneros. En algunas realizaciones, la célula fúngica modificada genéticamente es seleccionada de las cepas del *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia heterothallica*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia terrestris* y *Myceliophthora thermophila*, incluyendo sus anamorfos y teleomorfos. No se pretende que la invención presente se limite a cualquier género particular dentro de la familia Chaetomiaceae. En algunas realizaciones adicionales, la célula fúngica modificada genéticamente es una especie termófila de *Acremonium Arthroderma*, *Corynascus*, *Thielavia*, *Myceliophthora*, *Thermoascus*, *Chromocleista*, *Byssoschlamys*, *Sporotrichum*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Scytalidium*, *Ctenomyces*, *Paecilomyces* y *Talaromyces*. Se entenderá que para todas las especies mencionadas, la célula fúngica modificada genéticamente presentada en este documento abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos y otros equivalentes taxonómicos (por ejemplo, anamorfos), sin importar el nombre por el que se conocen (véase por ejemplo, Cannon, *Mycopathol.*, 111:75-83 [1990]; Moustafa et al., *Persoonia* 14:173-175 [1990]; Upadhyay et al., *Mycopathol.*, 87:71-80 [1984]; Alcancia et al., *Mycotaxon* 23:419-427 [1985]; Awao et al., *Mycotaxon* 16: 436-440 [1983]; y von Klopotek, *Arch Microbiol.*, 98:365-369 [1974]). Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados. En consecuencia, se entenderá que, a menos que se indique lo contrario, el uso de una designación de la especie en particular en la divulgación de la presente también se refiere a especies que están relacionadas por una relación anamórfica o teleo-mórfica. Por ejemplo, las siguientes especies son anamorfos o teleomorfos y por lo tanto pueden ser consideradas como sinónimas: *Myceliophthora thermophila*, *Sporotrichum thermophile*, *Sporotrichum Thermophilum*, *Chrysosporium cellulophilum*, *Chrysosporium thermophile*, *Corynascus heterothallicus* y *Thielavia heterothallica*.

[0269] En algunas realizaciones, las células fúngicas modificadas genéticamente en la página web son células fúngicas productoras de celulasa. En algunas realizaciones, las células fúngicas productoras de celulasa expresan y secretan una mezcla de enzimas de hidrólisis de celulosa. En algunas realizaciones, las células fúngicas modificadas genéticamente previstas aquí son células fúngicas de la familia Chaetomiaceae que secretan dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa (por ejemplo, endoglucanasa, celobiohidrolasa, y/o beta-glucosidasa). En algunas realizaciones adicionales, las células fúngicas productoras de celulasa producen dos o más de estas enzimas, en cualquier combinación.

[0270] Adicionalmente, en algunas realizaciones, la célula fúngica modificada genéticamente se deriva de una célula fúngica parental lignocelulosa-competente. En algunas realizaciones, células fúngicas lignocelulosa-competentes segregan una o más peroxidases de lignina, peroxidases de manganeso, lacasas y/o deshidrogenasa celobiosa (CDH).

[0271] La divulgación presente también prevé un cultivo fungicida en un recipiente que comprende una célula fúngica modificada genéticamente como se ha descrito arriba. En algunas realizaciones, el recipiente cuenta con un

medio líquido, como el medio de fermentación. Por ejemplo, el recipiente puede ser un matraz, reactor de bioprocesos o cualquier recipiente adecuado. En algunas realizaciones, el recipiente comprende un medio de crecimiento sólido. Por ejemplo, el medio sólido puede ser un medio de agar tal como agar de dextrosa de patatas, carboximetilcelulosa, agar de harina de maíz, y cualquier otro medio adecuado. En algunas realizaciones, la célula fúngica descrita anteriormente es una célula fúngica aislada.

Deshidrogenasa celobiosa.

[0272] Como se indica en el presente documento, los términos "deshidrogenasa celobiosa" y "CDH" se refieren a una celobiosa: aceptor 1-oxidoreductasa que cataliza la conversión de celobiosa en presencia de un aceptor de cellobiono-1,5-lactona y un aceptor reducido. Ejemplos de deshidrogenasas de celobiosa caen en la clasificación de enzimas (E.C. 1.1.99.18). Típicamente 2,6-dicloroindofenol puede actuar como aceptor, como hierro, especialmente $\text{Fe}(\text{SCN})_3$, oxígeno molecular, ubiquinona, o citocromo C, y otros polifenoles, tales como la lignina. Los sustratos de la enzima incluyen celobiosa, cello-oligosacáridos, lactosa y D-glucosil-1,4- β -D-manosa, glucosa, maltosa, manobiosa, tiocelobiosa, galactosilo-manosa, xilobiosa, xilosa. Donadores de electrones incluyen beta-1-4 dihexosas con glucosa o manosa en el extremo reductor, aunque alfa 1-4 hexósidos, hexosas, pentosas, y beta-1-4 pentomers pueden actuar como sustratos para al menos algunas de estas enzimas (Véase e.g, Henriksson et al, *Biochim Biophys Acta Prot Struct Mol Enzymol*, 1383: 48-54 [1998]; y Schou et al, *Biochem J.*, 330: 565-571 [1998]).

[0273] En algunas realizaciones, una enzima CDH contiene tanto glucosa-metanol-colina (GMC) oxido-reductasa N conservada y los dominios GMC oxido-reductasa C. En algunas otras realizaciones, un CDH contiene dominio GMC oxido-reductasa N solo. Las oxidoreductasas GMC son oxidoreductasas de flavoproteína FAD (Véase, por ejemplo, Cavener, *J. Mol Biol*, 223: 811-814 [1992]; y Vrielink y Blow, *Biochem*, 32: 11507-15 [1993]). Las oxidoreductasas GMC incluyen una variedad de proteínas, tales como la deshidrogenasa de colina, oxidasa de metanol, y deshidrogenasa celobiosa (CDH), que comparten un número de regiones con similitudes de secuencia. Una de estas regiones, que se encuentra en la sección N-terminal, se corresponde con el dominio de unión FAD ADP, que se describe por la base de datos Pfam en la entrada GMC_oxred_N (PF00732). Del mismo modo, el dominio conservado C-terminal (dominio GMC oxido-reductasa C) se define como se establece en la base de datos Pfam en la entrada GMC_oxred_C (PF05199).

[0274] La deshidrogenasa celobiosa se puede clasificar en dos familias. La primera familia contiene una porción catalítica y la segunda familia contiene una porción catalítica y un motivo de unión a celulosa (CBM). La estructura 3-dimensional de una deshidrogenasa celobiosa ejemplar cuenta con dos dominios globulares, conteniendo cada uno uno de dos cofactores, a saber, un hemo o una flavina. El sitio activo se encuentra en una hendidura entre los dos dominios. La oxidación de celobiosa se produce normalmente a través de transferencia de 2 electrones de celobiosa a la flavina, generando cellobiono-1,5-lactona y flavina reducida. El FAD activo se regenera mediante la transferencia de electrones al grupo hemo, dejando un hemo reducido. El hemo de estado nativo se regenera mediante la reacción con el sustrato oxidante en el segundo sitio activo. En algunas formas de realización, el aceptor es preferentemente ferricianuro de hierro, citocromo C, o un compuesto fenólico oxidado como dicloroindofenol (DCIP), un aceptor comúnmente utilizado para ensayos colorimétricos. Los iones metálicos y O_2 también son aceptores, pero para la mayoría de las deshidrogenasas celobiosas la velocidad de reacción de celobiosa oxidada para estos aceptores es varios órdenes de magnitud inferior a la observada para el hierro o oxidantes orgánicos. Tras la liberación celobionolactona, el producto puede someterse a apertura de anillo espontánea para generar ácido celobiónico (Véase, por ejemplo, Hallberg et al, *J. Biol Chem*, 278: 7.160-7.166 [2003]). Los expertos en la técnica apreciarán que la actividad de la enzima deshidrogenasa celobiosa emplea típicamente la presencia de oxígeno o un aceptor de redox equivalente, que puede ser, por ejemplo, lignina, oxígeno molecular, el citocromo c, colorantes redox, benzoquinonas y/o complejos de Fe^{2+} .

[0275] La actividad de deshidrogenasa celobiosa se puede medir usando cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Schou et al, *Biochem J.*, 220: 565-71 [1998]). Por ejemplo, la reducción DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) por la actividad CDH en presencia de celobiosa se puede controlar mediante la absorbancia a 530 nm.

[0276] Una célula fúngica que se ha modificado genéticamente para reducir la actividad secretada de una deshidrogenasa celobiosa típicamente ha reducido la actividad secretada de una deshidrogenasa celobiosa endógena. En consecuencia, uno o más enzimas de deshidrogenasa celobiosa de cada una de las especies de hongos descritas en este documento pueden ser dirigidas para la modificación genética. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es de una especie de hongo de la familia Chaetomiaceae. Algunos ejemplos de enzimas de deshidrogenasa celobiosa identificadas a partir de miembros de la familia Chaetomiaceae se exponen en la Tabla 1, a continuación. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es de una especie de hongos seleccionados de *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia heterothallica*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia terrestris*, *Chaetomium globosum* y *thermophila Myceliophthora*. Algunas enzimas de deshidrogenasa celobiosa identificadas a partir de estas especies se exponen en la siguiente tabla. Las proteínas enumeradas en la tabla siguiente son ejemplos de deshidrogenasa celobiosa que son conocidas en la técnica, o identificadas en este documento como una deshidrogenasa celobiosa.

Tabla 1. Secuencias de deshidrogenasa celobiosa					
Número de entrada	Organismo	Dominio oxred N	GMC	Dominio oxred C	GMC
AAC26221	<i>Myceliophthora thermophila</i>	251-554		645-781	
XP_001229896.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148,51	226-529		620-757	
JGITHite5441	<i>Thielavia terrestris</i>	253-555		647-783	
JGITHite4524	<i>Thielavia terrestris</i>	36-337		NA	
XP_001225932.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148,51	36-338		NA	
JGITHite6738	<i>Thielavia terrestris</i>	249-550		642-779	
CDH2 derivada de una cepa C1	<i>Myceliophthora thermophila</i>	249-550		NA	
XP_001226549.1	<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148,51	249-521		549-667 g	
* Números de entrada de <i>Thielavia terrestris</i> se refieren al U.S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute (JGI)					

20 **[0277]** Ciertas secuencias de aminoácidos que codifican deshidrogenasa celobiosa se proporcionan en este documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica *Myceliophthora thermophila* CDH1 se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos codificada de *Myceliophthora thermophila* CDH1 se expone como SEQ ID NO: 2.

25 **[0278]** En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es deshidrogenasa celobiosa CE 1.1.99.18. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es una deshidrogenasa celobiosa con la secuencia de aminoácidos de *Myceliophthora thermophila* CDH1 como se expone en SEQ ID NO: 2. En algunas otras realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada GenBank de cualquiera de los números de acceso indicados en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, alrededor de 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada GenBank de cualquiera de los números de acceso indicados en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es codificada por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridarse selectivamente con la SEQ ID NO: 1, en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas, como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa es codificada por una secuencia de ácido nucleico que puede hibridarse selectivamente en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia de ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos proporcionada en la entrada GenBank de cualquiera de los números de acceso indicados en la Tabla 1.

60 **[0279]** En algunas realizaciones, la deshidrogenasa celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 50%, aproximadamente 51%, aproximadamente 52%, aproximadamente 53%,

aproximadamente 54%, aproximadamente 55 %, aproximadamente 56%, aproximadamente 57%, aproximadamente 58%, aproximadamente 59%, aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%,
 5 aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85% aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%,
 10 aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de similitud con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácido proporcionada en la entrada de GenBank de cualquiera de los números de acceso indicados en la Tabla 1. Las secuencias de deshidrogenasa celobiosa se pueden identificar por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un alineamiento de secuencias puede
 15 llevarse a cabo contra una base de datos, por ejemplo, contra la base de datos NCBI, y secuencias con el valor E más bajo HMM pueden ser seleccionadas.

[0280] En algunas realizaciones, las células fúngicas se han modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad de la deshidrogenasa celobiosa a partir de dos o más enzimas de deshidrogenasa celobiosa endógenas secretadas por la célula. En algunas realizaciones, una primera de las dos o más deshidrogenasas de celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 61%,
 20 aproximadamente 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente
 25 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%,
 30 aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% idéntica a SEQ ID NO: 2, y una segunda de las dos o más enzimas de deshidrogenasa celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente
 35 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%,
 40 aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% idéntica a SEQ ID NO: 2.

Mezclas de enzimas

[0281] También se describen en la presente memoria mezclas de enzimas que comprenden al menos una o más enzimas hidrolizantes de celulosa expresadas por una célula fúngica que se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad deshidrogenasa celobiosa endógena secretada por la célula, como se describe en el presente documento. Las enzimas celulasas son producidas por una amplia variedad de microorganismos. Las celulasas (y hemicelulasas) de hongos filamentosos y algunas bacterias son ampliamente explotadas para muchas
 50 aplicaciones industriales que implican el procesamiento de fibras naturales a los azúcares. Se contempla que las mezclas de cualquier enzima establecidas en este documento encontrarán uso en la presente invención.

[0282] En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla de enzimas comprende al menos una o más enzimas hidrolizantes de celulosa expresadas por una célula fúngica que se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad de la deshidrogenasa celobiosa endógena que es secretada por la célula, como se describe en este documento. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una célula que utiliza lignocelulosa de la familia Chaetomiaceae. En algunas realizaciones, la célula fúngica modificada genéticamente prevista en este documento es un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* o *Chaetomium*. En algunas otras realizaciones, la célula fúngica modificada genéticamente puede ser también un anamorfo o teleomorfo de un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus* o *Chaetomium*. Además, la célula fúngica modificada genéticamente también se puede seleccionar de *Sporotrichum* o *Acremonium* o *Talaromyces*. También se contempla que la célula fúngica modificada genéticamente puede seleccionarse de *Ctenomyces*, *Thermoascus*, y *Scytalidium*, incluyendo anamorfos y teleomorfos de células fúngicas de los géneros. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie seleccionada del *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia heterothallica*, *Corynascus heterothallicus*, *Thielavia terrestris*, *Chaetomium globosum*
 65 *Talaromyces stipitatus* y *Myceliophthora thermophila*, incluyendo anamorfos y teleomorfos de los mismos.

[0283] Además de las enzimas descritas anteriormente, otras enzimas tales como las lacasas encuentran uso en las mezclas de la presente descripción. Las lacasas son de cobre que contiene enzimas oxidasas que se encuentran en muchas plantas, hongos y microorganismos. Las lacasas son enzimáticamente activas en fenoles y moléculas similares y realizan una oxidación de un electrón. Las lacasas pueden ser poliméricas y la forma enzimáticamente activa puede ser un dímero o trímero.

[0284] Peroxidasas dependientes de Mn también encuentran uso en mezclas de la presente descripción. La actividad enzimática de la peroxidasa dependiente de Mn (MnP) depende de Mn^{2+} . Sin estar limitado por la teoría, se ha sugerido que la función principal de esta enzima es la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} (Véase, por ejemplo, Glenn et al Arco Biochem Biophys, 251: 688-696 [1986]). Posteriormente, los sustratos fenólicos son oxidados por el Mn^{3+} generado.

[0285] Peroxidasas de lignina también encuentran uso en las mezclas de la presente descripción. La peroxidasa de lignina es un hemo extracelular que cataliza la despolimerización oxidativa de las soluciones diluidas de la lignina polimérica *in vitro*. Algunos de los sustratos de LiP, en particular alcohol de 3,4-dimetoxibencilo (alcohol veratrílico, VA), son compuestos redox activos que se han demostrado para actuar como mediadores redox. VA es un metabolito secundario producido al mismo tiempo que LiP por cultivos ligninolíticos de *P. Chrysosporium* y sin pretender imponer ninguna teoría, se ha propuesto para funcionar como un mediador redox fisiológico en la oxidación catalizada de LiP de la lignina *in vivo* (Véase, por ejemplo, Harvey et al, FEBS Lett, 195: 242-246 [1986]).

[0286] En algunas realizaciones de la descripción, puede ser ventajoso utilizar una mezcla de enzimas libre de células. Una mezcla de enzimas libre de células comprende típicamente enzimas que han sido separadas de las células, incluyendo las células que secretan las enzimas. Mezclas de enzimas libres de células se pueden preparar usando cualquiera de una variedad de metodologías apropiadas que se conocen en la técnica (por ejemplo, filtración o centrifugación). En algunas formas de realización, la mezcla de enzimas es parcialmente libre de células, sustancialmente libre de células, o totalmente libre de células.

[0287] En algunas realizaciones de la descripción, dos o más celulasas y cualesquiera enzimas adicionales presentes en la mezcla de enzimas de celulasas son secretadas a partir de una sola célula fúngica modificada genéticamente o por diferentes microbios en las fermentaciones combinadas o separadas. Del mismo modo, dos o más celulasas y cualesquiera enzimas adicionales presentes en la mezcla de enzimas de celulasas se pueden expresar de forma individual o en subgrupos de diferentes cepas de diferentes organismos y las enzimas combinadas *in vitro* para realizar la mezcla de enzimas de celulasas. También se contempla que las celulasas y las enzimas adicionales en la mezcla de enzimas se expresan de forma individual o en subgrupos de diferentes cepas de un solo organismo, y las enzimas combinadas para realizar la mezcla de enzimas de celulasas.

[0288] En algunas realizaciones de la divulgación, la mezcla de enzimas comprende al menos una o más enzimas hidrolizantes de celulosa expresadas por una célula fúngica que se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad de la deshidrogenasa celobiosa endógena que es secretada por la célula, como se describe en este documento. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una célula de utilización de lignocelulosa de la familia Chaetomiaceae. En algunas realizaciones, la célula fúngica modificada genéticamente proporcionada en este documento es un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus*, y *Chaetomium*. La célula fúngica modificada genéticamente puede ser también un anamorfo o teleomorfo de un miembro de la familia Chaetomiaceae seleccionado de *Myceliophthora*, *Thielavia*, *Corynascus*, y *Chaetomium*. Además, la célula fúngica modificada genéticamente también se puede seleccionar de *Sporotrichum*, *Acremonium*, *Ctenomyces*, *Scytalidium* y *Thermoascus*, incluyendo anamorfos y teleomorfos de células fúngicas de estos géneros. En algunas realizaciones, la célula fúngica es una especie seleccionada del *Sporotrichum cellulophilum*, *Thielavia heterothallica*, *heterothallicus Corynascus*, *Thielavia terrestris*, *Chaetomium globosum*, *Talaromyces stipitatus*, y *thermophila Myceliophthora*, incluyendo sus anamorfos y teleomorfos.

[0289] Una mezcla de enzimas de celulasas de la presente invención se produce en un proceso de fermentación en el que las células fúngicas descritas en este documento se hacen crecer en fermentación sumergida de cultivo líquido. En algunas realizaciones, las fermentaciones líquidas sumergidas de células fúngicas se incuban usando lotes, lotes alimentados o proceso continuo. En un proceso por lotes, todos los materiales necesarios, con la excepción de oxígeno para procesos aeróbicos, se colocan en un reactor al comienzo de la operación y se permite que la fermentación proceda hasta su terminación, en cuyo punto se recoge el producto. En algunas realizaciones, los procesos por lotes para la producción de la mezcla de enzimas de la presente invención se llevan a cabo en un frasco de agitación o un biorreactor. En algunas realizaciones en las que se utiliza un proceso de alimentación por lotes, el cultivo se alimentó de forma continua o secuencialmente con uno o más componentes de medios de comunicación sin la eliminación del fluido de cultivo. En los procesos continuos, medio fresco se suministra y el fluido de cultivo se retira continuamente a tasas volumétricamente iguales para mantener el cultivo a una tasa de crecimiento constante. Los expertos en la técnica apreciarán que medio de fermentación es típicamente líquido, y comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, así como otros nutrientes, vitaminas y minerales que pueden añadirse a los medios de fermentación para mejorar el crecimiento y la producción de enzimas de células fúngicas. Estos otros componentes de medios se pueden añadir antes de, simultáneamente con o después de la inoculación del cultivo con las células fúngicas.

[0290] En algunas realizaciones del proceso para la producción de la mezcla de enzimas de la presente invención, la fuente de carbono comprende un hidrato de carbono que inducirá la expresión de las enzimas de celulasa de la célula fúngica. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la fuente de carbono comprende una o más de celulosa, celobiosa, sóforosa, xilano, xilosa, xilobiosa, y/o oligo- o polisacáridos conocidos para inducir la expresión de celulasas y beta-glucosidasa en tales células fúngicas relacionadas. En algunas realizaciones que utilizan la fermentación por lotes, se añade la fuente de carbono al medio de fermentación antes de o simultáneamente con la inoculación. En algunas realizaciones que utilizan operaciones de alimentación por lotes o continuos, la fuente de carbono se suministra continuamente o intermitentemente durante el proceso de fermentación. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la fuente de carbono se suministra a una velocidad de alimentación de carbono de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2,5 g de carbono/L de cultivo/h, o cualquier cantidad intermedia adecuada.

[0291] Los métodos para producir la mezcla de enzimas de la presente invención se puede llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada, típicamente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C, o cualquier temperatura adecuada entre las mismas, por ejemplo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 80°C, 25°C a aproximadamente 65°C, o cualquier temperatura entremedia adecuada, o de aproximadamente 20°C, aproximadamente 22°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, aproximadamente 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 32°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 37°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 80°C, aproximadamente 85°C, aproximadamente 90°C, aproximadamente 95°C, y/o cualquier temperatura adecuada entremedia.

[0292] Los métodos para la producción de mezcla de enzimas de la presente invención puede llevarse a cabo a cualquier pH adecuado, típicamente de aproximadamente 3,0 a 8,0, o cualquier pH adecuado entremedio, por ejemplo de aproximadamente pH 3,5 a pH 6,8, o cualquier pH adecuado entremedio, por ejemplo de aproximadamente pH 3,0, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, o cualquier pH entremedio adecuado.

[0293] En algunas realizaciones, la mezcla de enzimas está contenida en un recipiente que comprende una célula fúngica modificada genéticamente como se describe aquí. En algunas realizaciones, el recipiente comprende un medio líquido. En algunas formas de realización, el recipiente es un frasco, reactor de bioprocesos, o cualquier otro recipiente adecuado. En algunas formas de realización, la mezcla de enzimas está en un volumen de líquido. En algunas realizaciones, el volumen de líquido puede ser mayor de aproximadamente 0,01 mL, aproximadamente 0,1 mL, aproximadamente 1 mL, aproximadamente 10 mL, aproximadamente 100 mL, aproximadamente 1000 mL, o mayor de aproximadamente 10 L, aproximadamente 50 L, aproximadamente 100 L, aproximadamente 200 L, aproximadamente 300 L, aproximadamente 400 L, aproximadamente 500 L, aproximadamente 600 L, aproximadamente 700 L, aproximadamente 800 L, aproximadamente 900 L, aproximadamente 1000 L, aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 50.000 L, aproximadamente 100.000 L, aproximadamente 250.000 L, aproximadamente 500.000 L o mayor de aproximadamente 1.000.000 L.

[0294] En algunas realizaciones, tras la fermentación, se utiliza el medio de fermentación que contiene las células fúngicas, o se utiliza el medio de fermentación que contiene las células fúngicas y la mezcla de enzimas, o la mezcla de enzimas se separa de las células fúngicas, por ejemplo mediante filtración o centrifugación, y la mezcla de enzimas en el medio de fermentación. En algunas realizaciones, los solutos de bajo peso molecular tales como componentes no consumidos del medio de fermentación se eliminan mediante ultrafiltración. En algunas formas de realización, la mezcla de enzima se concentra por evaporación, precipitación, sedimentación, filtración, o cualquier medio adecuado. En algunas formas de realización, los productos químicos tales como glicerol, sacarosa, sorbitol, etc., se añaden para estabilizar la mezcla de enzimas. En algunas realizaciones, otros productos químicos, tales como benzoato sódico o sorbato de potasio, se añaden a la mezcla de enzimas para prevenir el crecimiento de contaminantes microbianos.

Métodos para generar glucosa

[0295] La presente divulgación también proporciona procedimientos para la generación de glucosa, comprendiendo la puesta en contacto de la celulosa con la mezcla de enzimas descrita en el presente documento. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el proceso comprende la puesta en contacto de la celulosa con una mezcla de enzimas que comprende dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa, en las que al menos una de las dos o más enzimas hidrolizantes de celulosa se expresa por una célula fúngica tal como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, el método para la generación de glucosa a partir de celulosa mediante la mezcla de enzimas es la hidrólisis por lotes, la hidrólisis continua, o una combinación de las anteriores. En algunas formas

de realización, la hidrólisis se agita, sin mezclar, o una combinación de las anteriores.

[0296] Los métodos para la generación de glucosa a partir de celulosa puede llevarse a cabo a cualquier temperatura adecuada, que incluye entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 80°C, o cualquier temperatura adecuada entremedia, por ejemplo una temperatura de aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 80°C o cualquier temperatura adecuada entremedia, y un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, o cualquier pH adecuado entremedio, por ejemplo a un pH de aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, o cualquier pH adecuado entremedio. La concentración inicial de la celulosa en el reactor de hidrólisis, antes del inicio de la hidrólisis, es preferiblemente de aproximadamente 0,1% (en peso) a aproximadamente 15% (en peso), o cualquier cantidad adecuada entremedia, por ejemplo aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15%, o cualquier cantidad intermedia adecuada.

[0297] La dosificación de la mezcla de enzimas de celulasa puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa, o cualquier cantidad intermedia adecuada, por ejemplo aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100 mg de proteína por gramo de celulosa o cualquier cantidad adecuada entremedia. La hidrólisis se puede llevar a cabo durante un período de tiempo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 200 horas, o cualquier tiempo adecuado entremedio. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la hidrólisis se lleva a cabo durante un período de aproximadamente 15 horas a aproximadamente 100 horas, o en cualquier momento entremedio, o puede llevarse a cabo por aproximadamente 0,5 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 50 horas, aproximadamente 55 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 65 horas, aproximadamente 70 horas, aproximadamente 75 horas, aproximadamente 80 horas, aproximadamente 85 horas, aproximadamente 90 horas, aproximadamente 95 horas, aproximadamente 100 horas, aproximadamente 120 horas, aproximadamente 140 horas, aproximadamente 160 horas, aproximadamente 180 horas, aproximadamente 200 horas, o cualquier tiempo adecuado entremedio. Se debe apreciar que las condiciones de reacción no están destinadas a limitar la invención de ninguna manera y se pueden ajustar como se desee por los expertos en la técnica.

[0298] En algunas realizaciones de la descripción, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo típicamente en un reactor de hidrólisis. La mezcla de enzimas se añade a la materia prima lignocelulósica pretratada (también denominada el "sustrato") antes de, durante, o después de la adición del sustrato al reactor de hidrólisis.

[0299] En los métodos de puesta en contacto del material celulósico con una mezcla de enzimas, varias condiciones ambientales se pueden ajustar de acuerdo con cualquier variedad de métodos conocidos en la técnica con el fin de maximizar la formación de un producto de hidrólisis tal como glucosa. Por ejemplo, temperatura, pH, % de oxígeno disuelto, y velocidad de agitación se puede ajustar de forma independiente. En algunas formas de realización, la mezcla de enzimas es una mezcla libre de células, como se describe en el presente documento.

[0300] Los métodos para la generación de glucosa, como se describe en el presente documento, usando la mezcla de enzimas con una actividad reducida de de deshidrogenasa celobiosa resulta en un mayor rendimiento de glucosa a partir de la celulosa enzimáticamente hidrolizada de un proceso correspondiente usando una mezcla de enzimas con su asignación completa de actividad de la deshidrogenasa celobiosa. Además, tales métodos resultan en la conversión reducida de los productos de celobiosa en el hidrolizado enzimático para productos oxidados.

[0301] En algunos métodos que utilizan las células modificadas genéticamente y/o mezclas de enzimas descritas en el presente documento, un rendimiento mejorado de la glucosa puede medirse y cuantificarse. Como se describe aquí, el rendimiento de glucosa se puede describir en términos de la cantidad de glucosa generada por el rendimiento máximo teórico de glucosa, o en términos de G_{max} . Se apreciará por los expertos en la técnica que cuando el cálculo de los valores teóricos tales como G_{max} y el rendimiento de glucosa máxima teórica, la masa de dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno que se agregan a la molécula de glucosa en el curso de la reacción de hidrólisis se tiene en cuenta. Por ejemplo, cuando se hidroliza un polímero de unidades de glucosa "n", unidades de agua (n-1) se añaden a las moléculas de glucosa formadas en la hidrólisis, por lo que el peso de la glucosa producida es de aproximadamente 10% mayor que el peso de celulosa consumida en la hidrólisis (por ejemplo, la hidrólisis de 1 g de celulosa produce aproximadamente 1,1 g de glucosa). Por lo tanto, como un ejemplo, donde 5 g de celulosa total disponible está presente en el inicio de una reacción de hidrólisis, y 2 g de celulosa residual que queda después de la reacción, la celulosa hidrolizada total es de 3 g de celulosa. Se obtuvo un rendimiento de glucosa máxima teórica de 100% (en peso) en las condiciones de reacción es de aproximadamente 5,5 g de

glucosa. Gmax se calcula basándose en la 3 g de celulosa se publicó o convirtió en la reacción de hidrólisis. Por lo tanto, en este ejemplo, un Gmax de 100% (en peso) es de aproximadamente 3,3 g de glucosa. Los niveles de celulosa, o bien la cantidad total disponible presente en el sustrato, o bien la cantidad de celulosa hidrolizada o residual, se pueden cuantificar mediante cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica, tales como por espectroscopia de IR o mediante la medición de la cantidad de glucosa generada por hidrólisis ácida concentrada de la celulosa (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos nº 6.090.595 y 7.419.809).

[0302] Por ejemplo, en algunas realizaciones de la descripción, el contenido de celulosa se determina por hidrólisis ácida de la celulosa, seguido de determinación de la concentración de glucosa, teniendo en cuenta el agua necesaria para hidrolizar la celulosa (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos nº 6.090.595 y 7.419.809). En un ejemplo, una suspensión de material de alimentación se centrifugó, se lavó con agua, y se suspendió en ácido sulfúrico a una concentración de ácido sulfúrico neto de 70%. Se incubó la suspensión a 40°C durante 30 minutos, seguido por dilución en agua desionizada a ácido sulfúrico 2%. En este punto de tiempo, las muestras son de vapor en autoclave a 121°C durante 1 hora, para convertir los oligómeros en glucosa monómera. La concentración de glucosa se mide por HPLC o cualquier ensayo enzimático adecuado. En algunas formas de realización alternativas, el contenido de celulosa se analizó por espectroscopia de infrarrojos como se describe en el Ejemplo 1. Por ejemplo, los sólidos se pueden lavar y se colocan en el cristal de detección de un espectrómetro de infrarrojos y la absorbancia medida entre 500-4000 cm⁻¹.

[0303] Los niveles de glucosa se pueden cuantificar mediante cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.090.595 y 7.419.809). Por ejemplo, las concentraciones de glucosa se pueden determinar usando un ensayo enzimático acoplado basado en la glucosa oxidasa y peroxidasa de rábano picante (Véase, por ejemplo, Trinder, Ann Clin Biochem, 6: 24-27 [1969]). Métodos adicionales de cuantificación de la glucosa incluyen métodos cromatográficos (véase por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.090.595 y 7.419.809). Los niveles de celobiosa se pueden medir por cualquier número de métodos de HPLC adecuados conocidos por expertos en la técnica (Véase, por ejemplo, Kotiranta et al, Appl Biochem Biotechnol, 81: 81 a 90 [1999]).

[0304] Del mismo modo, la disminución de la conversión de celobiosa y productos de glucosa a productos oxidados tales como celobionolactona y gluconolactona se pueden cuantificar mediante cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, los productos de la glucosa o de la oxidación celobiosa pueden ser detectados y cuantificados mediante espectroscopia de infrarrojos, o por metodologías cromatográficas tales como HPLC (Véase, por ejemplo, Rakotomanga et al, J. Chromatog B., 4: 277-284 [1991]; y Mansfield et al, Appl Environ Microbiol, 64: 3804-3809 [1997]). En consecuencia, la oxidación total de glucosa o celobiosa se puede determinar, por ejemplo, como una función del total de productos de oxidación por rendimiento máximo teórico de glucosa, o como una función de Gmax.

Material celulósico

[0305] Cualquier material que contiene celulosa encuentra uso en la presente descripción. 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 se refuerza por la lignina polimérica reticulada de manera covalente a hemicelulosa. La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y por tanto 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 polimorfo, la celulosa se encuentra en el tejido vegetal principalmente como una matriz cristalina insoluble de cadenas de glucano paralelas. Las hemicelulosas normalmente se enlazan a la celulosa mediante hidrógeno, así como a otras hemicelulosas, que ayudan a estabilizar la matriz de la pared celular.

[0306] La celulosa se encuentra por lo general, por ejemplo, en los tallos, hojas, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y la madera de los árboles. El material celulósico puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos urbanos, residuos de papel y residuos de fábricas de pulpa (Véase, por ejemplo, Wiseloge et al., en Charles E. Wyman, (ed.), Manual de bioetanol, Taylor & Francis, Washington DC [1995], pp 105-118; Wyman, Biores Technol., 50: 3-16 [1994]; Lynd, Appl Biochem Biotechnol, 24/25: 695-719 [1990]; y Mosier et al, Adv Biochem Eng Biotechnol, 65: 23 a 40 [1999]). Se entiende que en algunas realizaciones, la celulosa está en forma de lignocelulosa, un material de la pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, hemicelulosa y en una matriz mixta. En algunas formas de realización, el material celulósico es la lignocelulosa.

[0307] Una materia prima lignocelulósica pretratada es un material de origen vegetal que, antes de tratamiento previo, contiene al menos 10% de celulosa (peso seco), más preferiblemente mayor que aproximadamente 30% de celulosa, incluso más preferiblemente mayor que 40% de celulosa, por ejemplo aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22 %, aproximadamente 23%, aproximadamente

24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente 29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 31%, aproximadamente 32%, aproximadamente 33%, aproximadamente 34%, aproximadamente 35%, aproximadamente 36%, aproximadamente 37%, aproximadamente 38%, aproximadamente 39%, aproximadamente 40%, aproximadamente 41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente 44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o cualquier porcentaje adecuado entremedio, y al menos aproximadamente 10% de lignina (peso seco), o al menos aproximadamente 12% (peso seco) y que ha sido sometido a procesos físicos y/o químicos para hacer que la fibra sea más accesible y/o receptiva a las acciones de enzimas celulolíticas. En algunas realizaciones, la materia prima lignocelulósica puede contener niveles más altos de celulosa después del tratamiento previo. Por ejemplo, si se emplea tratamiento previo con ácido, el componente de hemicelulosa se hidroliza, lo que aumenta el nivel relativo de celulosa. En este caso, la materia prima pretratada puede contener más de aproximadamente 20% de celulosa y más de aproximadamente 12% de lignina.

[0308] Materias primas lignocelulósicas que encuentran uso en la descripción incluyen, pero no se limitan a los residuos agrícolas tales como el rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de cebada, paja de arroz, paja de avena, paja de canola, paja de caña de azúcar y tallos de soja; los residuos del proceso de fibra, tales como fibra de maíz, pulpa de remolacha, fábricas de papel y residuos o bagazo de caña de azúcar; residuos forestales como la madera de álamo, otras maderas duras, madera blanda, y el aserrín; o hierbas tales como el pasto aguja, miscanthus, la hierba espinal, y la hierba cinta. En algunas realizaciones, la materia prima lignocelulósica se somete primero a la reducción de tamaño por cualquiera de una variedad de métodos incluyendo, pero no limitado a, fresado, rectificado, agitación, trituración, compresión/expansión, y/o otros tipos de acción mecánica. La reducción de tamaño por la acción mecánica puede ser realizada por cualquier tipo de equipo adaptado para el propósito, por ejemplo, pero no limitado a, un molino de martillos.

Tratamiento previo.

[0309] En algunas realizaciones de la descripción, un sustrato de la mezcla de enzimas comprende material celulósico pretratado. Así, por ejemplo, en algunos métodos que se describen en el presente documento, cualquier proceso de tratamiento previo conocido en la técnica se puede utilizar para interrumpir componentes de la pared celular vegetal de material celulósico (Véase, por ejemplo, Chandra et al, Adv Biochem Engin Biotechnol, 108: 67-93 [2007]; Galbe y Zacchi, Adv Biochem Biotechnol Engin, 108: 41-65 [2007]; Hendriks y Zeeman, Biores Technol., 100: 10-18. [2009]; Mosier et al., Biores Technol, 96: 673-686 [2005]; Taherzadeh y Karimi, Int J. Mol Sci., 9: 1621-1651 [2008]; y Yang y Wyman, biocombustibles Bioprod Bioref Biofr. 2: 26-40 [2008]).

[0310] En algunas realizaciones, el material celulósico se somete a reducción de tamaño de partículas, pre-remojo, humectación, lavado, o el acondicionamiento antes del tratamiento usando cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica. Tratamiento previos convencionales incluyen, pero no se limitan al tratamiento previo de vapor (con o sin explosión), tratamiento previo diluido con ácido, el tratamiento previo de agua caliente, el tratamiento previo alcalino, el tratamiento previo de cal, la oxidación húmeda, explosión mojada, expansión de la fibra de amoníaco, tratamiento previo amoníaco diluido, organosolv tratamiento previo, y el tratamiento previo biológico. El tratamiento previo adicional incluye percolación de amoníaco, ultrasonidos, electroporación, microondas, CO₂ supercrítico, H₂O supercrítico, el ozono, y tratamientos previos de irradiación gamma. En algunas realizaciones, el material celulósico se trata previamente antes de la hidrólisis y/o fermentación. En algunas formas de realización, el tratamiento previo se lleva a cabo preferiblemente antes de la hidrólisis. En algunas formas de realización alternativas, el tratamiento previo se lleva a cabo simultáneamente con la hidrólisis enzimática para liberar los azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, y/o celobiosa. En algunas realizaciones, la etapa de tratamiento previo en sí resulta en cierta conversión de biomasa en azúcares fermentables, incluso en ausencia de enzimas.

[0311] Tratamiento previo de vapor. En el tratamiento previo de vapor, material celulósico se calienta para interrumpir los componentes de pared celular vegetal, incluyendo la lignina, hemicelulosa y celulosa para hacer que la celulosa y otras fracciones (por ejemplo, hemicelulosas) sean accesible a las enzimas. El material celulósico se hace pasar por o a través de un recipiente de reacción donde se inyecta vapor para aumentar la temperatura a la temperatura requerida y la presión y se retiene en el mismo durante el tiempo de reacción deseado. En algunas formas de realización, el tratamiento previo de vapor se realiza preferiblemente a aproximadamente 140°C a aproximadamente 230°C, mientras que en otras formas de realización se realiza a aproximadamente 160°C a aproximadamente 200°C, y en realizaciones adicionales, se realiza a aproximadamente 170°C a aproximadamente 190°C, donde el rango de temperatura óptima depende de cualquier adición de un catalizador químico. En algunas realizaciones, el tiempo de residencia para el tratamiento previo de vapor es aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, mientras que en otras formas de realización es aproximadamente 3 a aproximadamente 12 minutos, y aún en otras formas de realización, es aproximadamente 4 a aproximadamente 10 minutos, donde el tiempo de residencia óptimo depende del rango de temperatura y cualquier adición de un catalizador químico. El tratamiento previo de vapor permite cargas de relativamente alto contenido de sólidos, por lo

que el material celulósico es generalmente sólo húmedo durante el tratamiento previo. El tratamiento previo de vapor se combina a menudo con una descarga explosiva del material después del tratamiento previo, que se conoce como la explosión de vapor, es decir, un rápido parpadeo a la presión atmosférica y el flujo turbulento del material para aumentar la superficie accesible por la fragmentación (véase por ejemplo, Patente de EE.UU. nº 4,451,648; Duff y Murray, *Biores Technol*, 855: 1-33 [1996]; Galbe y Zacchi, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 618-628 [2002]; y solicitud de Patente de EE.UU. publicada nº 2002/0164730). Durante el tratamiento previo de vapor, grupos de acetilo de hemicelulosa se escinden y el ácido resultante autocataliza la hidrólisis parcial de la hemicelulosa de monosacáridos y oligosacáridos. La lignina se elimina sólo en una medida limitada. Un catalizador tal como H₂SO₄ o SO₂ (típicamente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3% en peso) a menudo se añade antes del vapor de tratamiento previo, lo que disminuye el tiempo y la temperatura, aumenta la recuperación y mejora la hidrólisis enzimática (Véase por ejemplo, Ballesteros et al, *Appl Biochem Biotechnol*, 129-132: 496-508 [2006]; Varga et al, *Appl Biochem Biotechnol*, 113 a 116: 509-523 [2004]; y Sassner et al, *Enz Microb Technol.*, 39: 756-762 [2006]).

[0312] Tratamiento previo químico: El término "tratamiento químico" se refiere a cualquier tratamiento previo químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina. Los ejemplos de procesos de tratamiento previo químico adecuado incluyen, pero no se limitan a, tratamiento previo diluido con ácido, tratamiento previo diluido alcalino (Véase, por ejemplo, la solicitud publicada de patente de EE.UU. nº 2007/0031918 y 2007/0037259), el tratamiento previo de cal, oxidación húmeda, fibra de amoniaco/explosión de congelación o expansión (AFEX), percolación de amoniaco (APR), tratamiento previo diluido de amoniaco y tratamientos previos de organosolv (Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/110891, WO 2006/11899, WO 2006/11900 y WO 2006/110901).

[0313] En el tratamiento previo con ácido diluido, material celulósico se mezcla con ácido diluido, típicamente H₂SO₄, y agua para formar una suspensión, calentada por vapor a la temperatura deseada, y después de un tiempo de residencia brilló a la presión atmosférica. El tratamiento previo con ácido diluido se puede realizar con una serie de diseños de reactores (por ejemplo, reactores de flujo de pistón, reactores en contracorriente, o reactores de lecho de disminución contra-corriente continua) (Véase, por ejemplo, Duff y Murray, *supra*; Schell et al., *BioRes Technol*, 91: 179-188 [2004]; y Lee et al, *Adv Biochem Eng Biotechnol Eng.*, 65: 93-115 [1999]).

[0314] En algunas realizaciones de la descripción, el tratamiento previo de cal se realiza con carbonato de calcio, hidróxido sódico o amoniaco a bajas temperaturas de aproximadamente 85°C a aproximadamente 150°C y tiempos de residencia de aproximadamente 1 hora a varios días (Wyman et al, *Biores Technol*, 96: 1959-1966 [2005]; y Mosier et al, *Biores Technol* 96: 673-686 [2005]).

[0315] La oxidación húmeda es un tratamiento térmico previo realizado típicamente a aproximadamente 180°C a aproximadamente 200°C durante aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos con la adición de un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o sobre-presión de oxígeno (Véase por ejemplo, Schmidt y Thomsen, *Biores Technol*, 64: 139-151 [1998]; Palonen et al, *Appl Biochem Biotechnol*, 117: 1-17 [2004]; Varga y otros, *Biotechnol Bioeng*, 88: 567-574 [2004]; Martin et al, *J. Chem Technol Biotechnol*, 81: 1669-1677 [2006]). El tratamiento previo se realiza a preferentemente de aproximadamente 1% a materia seca de aproximadamente 40%, aproximadamente 2 a materia seca de aproximadamente 30%, o aproximadamente 5 a materia seca de aproximadamente 20%, y a menudo el pH inicial se incrementa por la adición de un álcali tal como carbonato de sodio. En algunas realizaciones, una modificación del método de tratamiento previo de oxidación húmeda, conocido como explosión húmeda (combinación de oxidación en húmedo y de explosión a vapor), encuentra su uso. Este método puede manejar materia seca de hasta aproximadamente 30%. En explosión mojada, se introduce el agente oxidante durante el tratamiento previo después de un cierto tiempo de residencia. El tratamiento previo se terminó a continuación mediante el parpadeo de la presión atmosférica (Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/032282).

[0316] En algunas realizaciones de la descripción, la expansión de la fibra de amoniaco (AFEX) se utiliza. Este método implica el tratamiento de material celulósico con amoniaco líquido o gaseoso a temperaturas moderadas, tales como aproximadamente 90 a aproximadamente 100°C y alta presión tal como aproximadamente 17 a aproximadamente 20 bar durante aproximadamente 5 a aproximadamente 10 minutos, donde el contenido de materia seca puede estar de hasta aproximadamente 60% (Véase, por ejemplo, Gollapalli et al, *Appl Biochem Biotechnol*, 98: 23-35 [2002]; Chundawat y otros, *Biotechnol Bioeng*, 96: 219-231 [2007]; Alizadeh et al, *Appl Biochem Biotechnol*, 121: 1133-1141 [2005]; y Teymouri et al, *Biores Technol*, 96: 2014-2018 [2005]). El tratamiento previo AFEX da como resultado la despolimerización de la celulosa y la hidrólisis parcial de la hemicelulosa. Complejos de lignina en hidratos de carbono se escinden. Tratamiento previo diluido de amoniaco utiliza soluciones más diluidas de amoniaco que AFEX y puede llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 100°C a aproximadamente 150°C, o cualquier temperatura adecuada entremedia (Véase, por ejemplo, la solicitud publicada de patente de EE.UU. nº 2007/0031918 y 2007/0037259). En algunas realizaciones, la duración del tratamiento previo diluido de amoniaco es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 minutos, o cualquier duración adecuada entremedia.

[0317] En algunas realizaciones de la descripción, el tratamiento previo de organosolv se utiliza. Este método delignifica material celulósico por extracción con etanol acuoso (aproximadamente 40% a aproximadamente 60% de etanol) a aproximadamente 160°C a aproximadamente 200°C durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60

minutos (Véase, por ejemplo, Pan et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 90: 473-481 [2005]; Pan et al, *Biotechnol Bioeng*, 94: 851-861 [2006]; y Kurabi et al, *Appl Biochem Biotechnol*, 121: 219-230 [2005]). El ácido sulfúrico se añade normalmente como un catalizador. En el tratamiento previo de organosolv, se elimina la mayor parte de la hemicelulosa.

5 **[0318]** Otros ejemplos de métodos de tratamiento previo adecuados son conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Schell et al, *Appl Biochem Biotechnol*, 105: 69 a 85 [2003]; Mosier et al, *Biores Technol*, 96: 673-686 [2005]; y la solicitud publicada de Patente de EE.UU nº 2002/0164730).

10 **[0319]** En algunas realizaciones de la descripción, el tratamiento previo químico se lleva a cabo preferiblemente como un tratamiento ácido, y más preferiblemente como una solución diluida continua y/o tratamiento ácido suave. El ácido es típicamente el ácido sulfúrico, pero otros ácidos también se pueden utilizar, tal como ácido nítrico, ácido fosfórico, cloruro de hidrógeno o mezclas de los mismos. tratamiento ácido suave se lleva a cabo en el intervalo de pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, o aproximadamente 1 a aproximadamente 4, o aproximadamente 1 a aproximadamente 3. En algunas realizaciones, la concentración de ácido está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20% en peso ácido, mientras que en otras formas de realización, que está en el intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10 % en peso de ácido, en otras realizaciones, está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 % en peso de ácido, y en aún otras realizaciones, se está en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2,0 % en peso de ácido. El ácido se pone en contacto con material celulósico y se mantuvo a una temperatura en el intervalo de preferiblemente aproximadamente 160°C a aproximadamente 220°C, y más preferiblemente de aproximadamente 165°C a aproximadamente 195°C, durante períodos que van de segundos a minutos a (por ejemplo, , aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 60 minutos).

25 **[0320]** En algunas realizaciones de la descripción, el tratamiento previo se lleva a cabo en una suspensión acuosa. En algunas realizaciones, material celulósico está presente durante el tratamiento previo en cantidades preferiblemente entre aproximadamente 10 a aproximadamente 80% en peso, o aproximadamente 20 a aproximadamente 70% en peso, o aproximadamente 30 a aproximadamente 60% en peso, o aproximadamente 50% en peso. El material celulósico pretratado puede estar sin lavar o se lava usando cualquier método adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, lavado con agua).

35 **[0321]** Tratamiento previo físico. El tratamiento previo físico puede implicar alta presión y/o alta temperatura (explosión de vapor). En algunas realizaciones, el tratamiento previo físico de alta presión consiste en presión en el intervalo de aproximadamente 300 a aproximadamente 600 psi, o aproximadamente 350 a aproximadamente 550 psi, o aproximadamente 400 a aproximadamente 500 psi, o alrededor de 450 psi. En algunas otras realizaciones, el tratamiento previo de alta temperatura implica el uso de temperaturas de tratamiento en el intervalo de aproximadamente 100°C a aproximadamente 300°C, o alrededor de 140°C a aproximadamente 235°C. En algunas realizaciones, el tratamiento previo mecánico se lleva a cabo en un sistema de proceso por lotes, pistola de vapor de hidrólisis que utiliza alta presión y alta temperatura como se definió anteriormente (por ejemplo, Sunds Hydrolyzer; Sunds Defibrator AB, Suecia).

45 **[0322]** Tratamiento previo físico y químico combinado. En algunas realizaciones de la descripción, tratamientos previos físicos y químicos combinados se utilizan. De hecho, el material celulósico se puede pretratar tanto física como químicamente. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la etapa de tratamiento previo implica tratamiento de ácido diluido o suave y tratamiento de alta temperatura y/o presión. Los tratamientos previos físicos y químicos pueden llevarse a cabo secuencialmente o simultáneamente, según se desee. En algunas formas de realización adicionales, el tratamiento previo mecánico también se utiliza en conjunción con los tratamientos previos físicos y químicos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el material celulósico se somete a tratamiento previo mecánico, químico, o físico, o cualquier combinación de los mismos, para promover la separación y/o liberación de la celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

50 **[0323]** Tratamiento previo biológico. En algunas realizaciones de la descripción, las técnicas de tratamiento previo biológicos encuentran uso. En algunas formas de realización, estos métodos implican la aplicación de microorganismos de lignina solubilizantes (Véase, por ejemplo, Hsu, en Wyman (ed), *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Taylor & Francis, Washington, DC, en las páginas 179-212 [1996]; Ghosh y Singh, *Adv Appl Microbiol.*, 39; (eds.) 295-333 [1993] McMillan, en Baker y Overend, *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15 [1994]; Gong et al, *Adv Biochem Biotechnol Ingeniero*, 65: 207-241 [1999]; Olsson y Hahn-Hägerdal, *Enz Microbial Tech.*, 18: 312-331 [1996]; y Vallander y Eriksson, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 42: 63-95 [1990]).

60 **[0324]** En algunas realizaciones de la descripción, los compuestos solubles derivados del proceso de tratamiento previo posteriormente se separan de los sólidos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la etapa de separación comprende uno o más de los medios mecánicos convencionales (por ejemplo, cribado, tamizado, centrifugación o filtración) para lograr la separación. En algunas otras realizaciones, los compuestos solubles no se separan de los sólidos tras el tratamiento previo. Los expertos en la técnica apreciarán que el tratamiento previo puede llevarse a cabo como un proceso por lotes, de alimentación por lotes o continuo. Se apreciará también que el

65

tratamiento previo puede llevarse a cabo a consistencia de sólidos baja, media o alta como se desee (Véase, por ejemplo, WO2010/022511).

Fermentación

5
 10
 15
 20
[0325] En algunas realizaciones de la descripción, los métodos para la generación de azúcar descrito en este documento comprenden además fermentación del azúcar resultante a un producto final. La fermentación implica la conversión de una fuente de azúcar de un producto final a través del uso de un organismo de fermentación. Cualquier organismo adecuado encuentra uso en la presente descripción, incluyendo microorganismos bacterianos y fúngicos (por ejemplo, levaduras y hongos filamentosos), adecuados para producir un producto final deseado. Especialmente los organismos de fermentación adecuados son capaces de fermentar (es decir, convertir), azúcares, tales como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y/o arabinosa, directa o indirectamente, en un producto final deseado. Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. En algunas formas de realización, se utilizan las cepas de levadura, incluyendo, pero no limitado a los siguientes géneros: el género *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae* y *S. uvarum*); *Pichia* (por ejemplo, *P. stipitis* y *P. pastoris*); *Candida* (por ejemplo, *C. utilis*, *C. arabinofennentans*, *C. diddensii*, *C. sonorensis*, *C. shehatae*, *tropicalis* C y *C. boidinii*). Otros organismos de fermentación incluyen, pero no se limitan a cepas de *Zymomonas*, *Hansenula* (por ejemplo, *H. polymorpha* y *H. anomala*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. fragilis*), y *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *S. pombe*).

25
 30
[0326] En algunas realizaciones, los organismos de fermentación son cepas de *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Zymomonas* (por ejemplo, *Z. mobilis*), *Zymobacter* (por ejemplo, *Z. palmae*), *Klebsiella* (por ejemplo, *K. oxytoca*), *Leuconostoc* (por ejemplo, *L. mesenteroides*), *Clostridium* (por ejemplo, *C. butyricum*), *Enterobacter* (por ejemplo, *E. aerogenes*) y *Thermoanaerobacter* (por ejemplo, *Thermoanaerobacter* BG1L1 [Véase, por ejemplo, Georgieva y Ahring, Appl Microbiol, Biotech, 77: 61-86] *T. ethanolicus*, *T. thermosaccharolyticum*, o *T. mathranii*), *Lactobacillus*, *Corynebacterium glutamicum* R, *Bacillus thermoglucosidaisus*, y *Geobacillus thermoglucosidaisus*. No se pretende que el organismo de fermentación se limita a estas cepas particulares, ya que cualquier organismo adecuado encuentra uso en la presente descripción.

35
 40
[0327] Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y pueden ser fácilmente determinados por un experto ordinario en la técnica. En algunas realizaciones que implican la fermentación de etanol por la levadura, la fermentación es típicamente continua de entre aproximadamente 1 hora a aproximadamente 120 horas, o aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas. En algunas formas de realización, la fermentación se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C, o entre aproximadamente 26°C y aproximadamente 34°C, o aproximadamente 32°C. En algunas realizaciones, el pH de la fermentación es de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 7, mientras que en algunas otras realizaciones, el pH es de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

45
 50
[0328] En algunas realizaciones, la hidrólisis enzimática y la fermentación se llevan a cabo en recipientes separados, de modo que cada reacción biológica puede ocurrir en virtud de sus respectivas condiciones óptimas (por ejemplo, temperatura). En algunas otras realizaciones, los métodos para la producción de glucosa a partir de celulosa se llevan a cabo simultáneamente con la fermentación en una reacción simultánea de sacarificación y fermentación (es decir, "SSF"). En algunas realizaciones, SSF se lleva a cabo típicamente a temperaturas de aproximadamente 28°C a aproximadamente 50°C, o alrededor de 30°C a aproximadamente 40°C, o aproximadamente 35°C a aproximadamente 38°C, que es un punto medio entre el óptimo de 50°C para la mayoría de mezclas de enzimas de celulasa y el óptimo de 28°C a aproximadamente 30°C para la mayoría de levadura. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna temperatura particular, ya que cualquier temperatura adecuada encuentra uso en la presente invención.

55
 60
[0329] En algunas realizaciones de la descripción, los métodos para la generación de glucosa comprenden, además, la fermentación de la glucosa a un producto final deseado. No se pretende que los métodos proporcionados en este documento se limitan a la producción de cualquier producto final específico. En algunas realizaciones, los productos finales incluyen alcoholes de combustible o químicos industriales precursores. Por ejemplo, en algunas formas de realización, los productos de fermentación incluyen productos químicos industriales precursoras tales como alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol y/o butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido butírico, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, y/o ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); los gases (por ejemplo, H₂ y/o CO₂); antimicrobianas (por ejemplo, penicilina y/o tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, y/o beta-caroteno); y/o hormonas. En algunas realizaciones, el producto final es un alcohol de combustible. Alcoholes de combustible adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a alcoholes inferiores tales como alcoholes metanol, etanol, butanol y propilo.

Expresión incrementada de enzimas hidrolizantes de sacáridos

65
[0330] La célula fúngica puede ser genéticamente modificada aún más para aumentar su producción de uno o más enzimas hidrolizantes de sacáridos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la célula fúngica sobreexpresa

un gen homólogo o heterólogo que codifica una enzima de hidrólisis de sacáridos tales como beta-glucosidasa. En algunas formas de realización, la una o más enzimas de hidrólisis de sacáridos es una enzima de celulasa descrita en este documento. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la enzima es cualquiera de una variedad de endoglucanasas, celobiohidrolasas, beta-glucosidasas, endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, esterasas acetilxilanas, esterasas de feruloil, y esterasas alfa-glucuronilo, y/o cualquier otra enzima implicada en la hidrólisis de sacáridos. En algunas realizaciones, la célula fúngica modificada genéticamente para aumentar la expresión de beta-glucosidasa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la célula fúngica comprende una secuencia de polinucleótido para la expresión incrementada de polinucleótido codificador de beta-glucosidasa. En algunas realizaciones, la célula fúngica se modifica genéticamente adicionalmente para eliminar los polinucleótidos que codifican una o más enzimas endógenas de deshidrogenasa celobiosa.

[0331] En algunas realizaciones, la enzima hidrolizante de sacáridos es endógena a la célula fúngica, mientras que en otras formas de realización, la enzima hidrolizante de sacáridos es exógena a la célula fúngica. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla de enzimas comprende además una enzima hidrolizante de sacárido que es heteróloga a la célula fúngica. Aún más, en algunas realizaciones, los métodos para la generación de glucosa comprenden la puesta en contacto de la celulosa con una mezcla de enzimas que comprende una enzima hidrolizante de sacárido que es heteróloga a la célula fúngica.

[0332] En algunas realizaciones, una célula fúngica es modificada genéticamente para aumentar la expresión de una enzima de hidrólisis de sacáridos usando cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la secuencia de polinucleótido que codifica la enzima de hidrólisis está adaptada para una mayor expresión en una célula fúngica huésped. Como se usa en este documento, una secuencia de polinucleótido que ha sido adaptada para la expresión es una secuencia de polinucleótido que se ha insertado en un vector de expresión o de otra manera modificada para contener los elementos reguladores necesarios para la expresión del polinucleótido en la célula huésped, posicionados de manera tal que se permita la expresión del polinucleótido en la célula huésped. Tales elementos reguladores necesarios para la expresión incluyen secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción y, opcionalmente, secuencias potenciadoras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una secuencia de polinucleótido se inserta en un vector plásmido adaptado para la expresión en la célula huésped fúngica.

EXPERIMENTAL

[0333] La presente invención se describe con más detalle en los siguientes Ejemplos, que no se destinan de ninguna manera a limitar el alcance de la invención como se reivindica.

[0334] En la descripción experimental a continuación, se aplican las siguientes abreviaturas: ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar), uM y mM (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); gm y g (gramos); mg (miligramos); ug y Mg (microgramos); L y l (litros); µl y mL (mililitro); cm (centímetros); mm (milímetros); um y µm (micrómetros); seg. (segundos); min (minuto(s)); h(s) (hora (s)); U (unidades); MW (peso molecular); rpm (revoluciones por minuto); °C (grados centígrados); % en peso (porcentaje en peso); c.r.a. (con respecto a); ADN (ácido desoxirribonucleico); ARN (ácido ribonucleico); HPLC (cromatografía líquida de alta presión); MS (espectrometría de masas); LC (cromatografía líquida); LC/MS (cromatografía líquida/espectroscopia de masas); LC/MS/MS (cromatografía líquida de espectrometría de masas/varias etapas); HMF (hidroximetilfurfural); YPD (extracto de levadura 10g/L; peptona 20g/L; dextrosa 20g/L); DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol); CV (co-volumen de UMN); NREL (National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO); ARS (ARS Culture Collection or NRRL Culture Collection, Peoria, IL); Lallemand (Lallemand Ethanol Technology, Milwaukee, WI); Cayla (Cayla-InvivoGen, Toulouse, Francia); Agilent New Brunswick (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ); Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania); GE Healthcare (GE Healthcare, Waukesha, WI); Bruker Optics (Bruker Optics, Inc., Billerica, MA); Specac (Specac, Inc., Cranston, RI); Invitrogen (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA); Alfalisa (Alphalyse, Inc., Palo Alto, CA); Promega (Promega, Corp., Madison, WI); Sartorius (Sartorius-Stedim Biotech, SA, Aubagne, Francia); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, FI [parte de Thermo Fisher Scientific]), CalBiochem (CalBiochem, EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ); y Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

[0335] Las siguientes secuencias CDH de *M. thermophila* (C1) encuentran uso en la presente invención. SEQ ID NOS: 1 y 2 proporcionan secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos CDH1, respectivamente. SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de CDH2, mientras que SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de CDH3, SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de CDH4, SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de CDH5, SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de CDH6, y SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de CDH7.

CDH1:

[0336]

atgaggacctctctcgtttaatcggtgcccttgcggcggcaacttggccttgcgcgagaacaacgcgccgtaacctcaccgacccg
 gactcgggcaftacctcaacacgtggggctcgcggaggatctccccagactaaggcgggttacttttgggtggtctcgcctctgatgccctc
 5 acgacagacgccaaaggagttcactcgggtacttgaatgcgcgaggaaacgatgagagcgggtgctcctcctgggcggcccatgacca
 actcgtctctcactcggccttggccccacgaggacaccgtctacacctctcgccttgcaccggctatgccatgccggatgctaccagggg
 gacgccgagatcaccaggtctcctcctctglcaactcagcgaacttcaagctcacttcaaggtgcgagaactccttcaatggagtaaaagcggc
 gccaccggcggtgccccacctcgaacggcgtgttggctcctggctgggtccaggcacttgcggacccggcaaccggacctgccccgaccag
 10 atccctcagcagcagcacaacggcatgggtatctggggctccaccgagacctctgtcgtcgggtgcccttccgacggcgctcgttcgattacat
 cagggccaccaagaccgtcaggggtactgcggcggtcccaccgagacctctgtcgtcgggtgcccttccgacggcgctcgttcgattacat
 cgtcgtggcgggcggtgccgggtggcatccccgccggcacaagctcagcagggccggcaagagtgtcgtcgtcactcagagaaggccttgcctc
 gaccgcaaccggaggcactctcggccccgagtggtcgcgagggccaccgacctacccttgcagtgccgggtgtgcaaccagatctgg
 15 gttgactccaaggggatcgttgcgaggaaccgaccagatggctggtcgtcctcggcgggcgtaccggctgaatgccggcctgtggttcaa
 gccctactcgtcgtactgggactaccttccctagtgttggaaagtaaacgctcagccggccatcaaccggcctctcgcgcacccccgg
 gcaccgatctcctcgcaccgacggcaagcgtactaccaaacggcttcgacgtcctcctcaaggccttggcggcgggcggctggacctcga
 tcacggccaalaacgcgccagacaagaagaaccgacctctcccatgcccccttcatgttcggcgggcgagcgaacggccgctggca
 20 cclactccagaccgccaagaagcgcagcaacttcaagcttggctcaacagctcggtaaacggcgtcaltccggcaggcgccacatcaccg
 gctcagaggtcagcggcttccgcgacggcggttaccaggcaltgctcccgtcaccagggttaccggcgctcaltcctctcgtcggcactt
 ggcaaggtcgaagatcctgctgaggagcggatcggctcgaacgatcagctgcaaggttgcggcctcggagaaaggatggccctaccatgaca
 gcaactcgtcctggatcaacctgctgctggctacaacctggatgaccacctcaaccggacactgctcctccccaccggcagctcgtctcaca
 25 ctctacagggcgtgggacaatccatccagctcgaacaaggacagctacctcaactcgcgcacggcctcctcggcaagcctcccaacatg
 ggctatgttctggaaagagatcaagggtcgggacggcattgttccagctccagtgactggcctgctcggcagcctgggtgcccccaa
 cggcaagaccatgaccatgctcagtaacctcggctggtgctcaccctcgcgcggccgatgaccatcaccctgctcctgacaactgctcctcgg
 acgtgccctacctcaaggaccaccaacgacaaggaggcctcctcagggcctcctcaacctgcagaacgcctcaagaacgtcggcaacctga
 30 cctggctcttccccaaactcaccatcagccgcgccaatacgttgcagacatggtcgtcctccccgagcaaccggcgctccaaccactggtggc
 accaacaagatcggcaccgacgacggcgcaaggcggtcctccgctcgtcgtcagctcaacaccaaggctctaccggcaccgacaacctctcgtc
 atcagcgcctcacttccccggcgtgcccaccaccaaccaccctctgacatcgtgacggcgtcggagcagcgcctcggccccgcatcctcgcct

gcccagacctcagccccgtccccaaagtacgggacgtgcggcgccgcgaatggagcggcagcttctgtcgcggcagggctccacgtgccaga
 35 tgcagaacgagtggtactcgcagtgcttgtga (SEQ ID NO:1)

MRTSSRLIGALAAALLPSALAQNNAPVTFTDTPDSGITFTWGLAEDSPQTKGGFTFVVALPSD
 ALTTDAKEFIGYLKCARNDESGWCGVSLGGPMTNSLLIAAWPIIEDTVYTSRFAATGYAMPD
 40 VYQGDAEITQVSSVNSTHIFSLIFRCENCLQWSQSGATGGASTSNGVLVLGWVQAFADPGNP
 TPCDQITLQHDNMGMIWGAQLNSDAASPSYTEWAAQATKTVTGDCGGPTETSUVGVVPT
 GVSFDYIVVGGGAGGIPAADKLEAGKSVLLIEKGFASANTGGTLGPEWLEGHDLTRFDVP
 GLCNQIWWVDSKGIACEDTDQMAGCVLGGGTAVNAGLWFKPYSLDWDYLFPSGWKYKDVQ
 PAINRALSRIPTDAPSTDGKRYQQGFDVLSKGLAGGGWTSVTANNAPDKKRNRTFSHAPF
 45 MFAGGERNGPLGTIFYQTAKKRSNFKLWLNTSVKRVIRQGGHITGVEVEPFRRDGGYQGVV
 TKVTGRVILSAGTFGSAKILLRSGIGPNDQLQVVAASEKDGPTMISNSSWINLPVGYNLDDHL
 NTDTVISHPDVVFYDFYEAWDNPIQSDKDSYLNRSRTGILAQAAPNIGPMFWEIKGADGIVRQ
 LQWTRVEGSLGAPNGKMTMTMSQYLGRGATSRGRMTTTPSLTTVVSDVPYLKDPNDKEAVI
 QGIINLQNALKNVANLTLWLPNSTTTPRQYVDSMVVSPSNRRSNHWMGTNKGITDDGRKGG
 SAVVDLNTKVYGTDLNFVIDASIFPGVPTTNPSTYIVTASEHASARILALPDLTPVPKYGQC
 GREWSGFVCADGSTCQMNEWYSQCL (SEQ ID NO:2)

CDH2:

50 **[0337]**
 MKLLSRVGATALAATLSLQQCAAQMTEGTYTDEATGIQFKTWTASEGAPFTFGLTLPADAL
 EKDATEYIGLLRCQITDPASPSWCGISHIQSGQMTQALLVAVASEDTVYTSFRYATGYTLP
 GLYTGDAKLTQISSVSEDSFEVLFRCENCFSWDQDGTGKGNVSTSNLNLVLGRAAAKDGVT
 GPTCPDTAEFGFHDNFGQWGAVLEGATSDSYEEWAKLATTTPETTCDGTGPGDKECVAP
 55 EDTYDYIVVAGAGGITVADKLEAGHKVLLIEKGGPSTGLWNGTMKPEWLESTDLTRFDV
 PGLCNQIWWVDSAGIACITDQDQMAGCVLGGGTAVNAGLWWKPHPADWDENFPEGWSSDL
 ADATERVFKRIPGTSHPSQDGKLYRQEGFEVISKLANAGWKEISANEAPSEKHNHYAHTEF
 MFSGGERGGPLATYLSAAERSNFNLWLNTAVRRRAVRSGSKYTGVELECLTDGGFSGTVNL
 NEGGGVIFSAAGAFSAKLLLRSGIGPEDQLEIVASSKDGETFTPKDEWINLPVGHNLIDHLNTD
 60 LIITHPDVVFYDFYAAWDEPITEDKEAYLNSRSGILAQAAPNIGPMMWDQVTPSDGITRQFQ
 WTCRVEGDSSKTNSTHAMTSLQYLGRGVVSRGRMGITSGLSTTVAEHPYLHNNGDLEAVIQ
 GIQNVVDALSQVADLEWVLPDGTVADYVNSLIVSPANRRANHWMGTAKLGTDDGRSGG
 TSVVDLDTKVYGTDLNFVVDASVFPGMSTGNPSAMIVIVAEQAAQRILALRS (SEQ ID NO:3)

CDH3:

[0338]

5 MKFLRKSDRGSVLGSTLFSIAFLFYSPTAAQSPPPDGA VYDYTVIGSGPGGGVVGANI.AKA
 GYSVLIJ.EAGDDSPGAGFGVYTPVTWDFYVKIHYPEGDPRDNQYSII.TWI.TPDGRYWVG
 QSGAPEGSRLGYYPRGATLGGSSMINAMVVWLPNDSWDYIIAEVTGDDSWRAENMIK
 IFQKIEKNNYLPRGTANIIGFDGWFQTQMGIMVQINRTGPLQGNGVMTTYAQDWNLIPMS
 10 DLLLRDPNEIGPDRDQTSIIYGQVSHQFANGNRYSSRHYVQDAVSSGANLTVSLTSLATRILF
 DTVTEPDSPRATGVEYLFKSLYRGDRRRADGAIGVNRTAVARREVIVSGGAFNSPQLLLS
 GIGNATELEALGIPVIRDLPGVGRNLMNDQEMPVIGTSGPGGGP GAVAGVAMYKTRHPAHG
 ERDMFLFGGPGFLFRGFWPNEAVIILPDEPAQPVYGVSMVKGSSVNNGGWVKLRSRDPIDT
 PEINFNIHYAVGAEYDLEAVKDTVAWIRSVYRRVGIATVEPPCARGPDENGYCGEEDEAWIII
 KQTFGHHTSTNKIGADDDPTAVLDSKFRVRGVRALRVVDASAFARIPGVFPVVSTFMISQK
 ASDDILAELEAESR (SEQ ID NO:4)

15 CDH4:

[0339]

MGFLAATLVSCAALASAASIPRPIIAKRQVSQLRDDYDFVIVGGGTSGLTVADRLTEAFPKN
 VLVIEYGDVHYAPGTFDPPIDWITPQPDAPPVSWFNSLPNPDMANITAFVLAGQVVGSSAV
 NGMFFDRASRHDYDAWTA VGGSGFEQSSHKWDWEGLFPPFQKSVTFTEPPADIVQKYHYT
 WDI.SAYGNSTPIYSSYPVTFQWADQPLI.NQAWQEMGINPVTECAGGDKEGVCWVPASQHP
 20 VTARRSIIAGLGIHYADVLPRANYDLLVQIIQVVRVVPNGPSIIGPPLVEARSLADNILENVT
 VKGEVIISAGALHTPTVLQRSIGIPASFLDDAGIPVTL.DLPGVGANLQDHCGPPVTWNYTEPY
 TGFFPLPSEMVNNAITFKAEAITGFDEVPARGPYTLAGGNNAIFVSLPHLTADYGAITANIRAM
 VADGTAASYLAADVRTIPGMVAGYEAQLLV.LADLLDNPEAPSLLETPWATSEAPQTSSVLAFL
 LLHPLSRGVSRLNLSDPLAQPVLDIRSGSNPVDIDLHLAHVRFLRGLLDTPTMQARGALETA
 25 PGSAVADSDEALGEYVRSHSTLSI.MHPCC.TAAML.PEDRGGVVGPI.DLKVHGAELRVVDMS
 VMPLLPGAILLSATAYAVGEKAADIIIQEWMDKEQ (SEQ ID NO:5)

CDH5:

[0340]

30 MELLRVSLAAVALSPLILFGVAAAHTPARSIARSTILDGADGLLPEYDYIIIGGGTSGLTVADR
 LTENRKRKFSRSPLETPSPARSSPAWCYSVLVLERGIFQNSSSVTTISGGSRGLIDPSLTFNINSV
 PQAGL.DNRSIAVIGGLI.GGSSGVNGI.QVLRGQREDYDRWGSYFGPNSDWSWKGLI.PYFKK
 AWNFHPPPELVSQFDIKYDPSYWGNTSDVHASFPITFWPVLKLEMAAFGDIPGVEYPPDSA
 SGETGAYWHPASVDPATVLRSFARPAHWDNIEAARNYHILTGQRVLKVAFDGNRATSVV
 FVPANATDHSTARSVKAKKEIVLAAGAIHTPQIL.QASGVGPKQVLKEAGVPLVVDAPGVGS
 35 NFQDQPYVVAPTFNFTKHPHDFYDMILNQTHIAEAQAQFEKDRITGPHITIASGYCGSWLPLQ
 IIPNSWKDIARRYESQDPAAYT.PAGTDETVIEGYRAQQKALARSMSRKSQSAMYNFTI.RGGY
 EFGSVVYLHPTSRGTVRINRSDFPFFSPEVDYRAI.SNPTDLEVI.I.EFTPFTRRYFLETRI.KSLD
 PVELSPGANVTAPADIEAWLRSVMIPSSHPIGTAAMLPRHLGGVVDENLLVYGVEGLSVVD
 ASVMPDLPGSYTQQTVYAIKAADLIKSRA (SEQ ID NO:6)

CDH6:

40 [0341]

MQVASKLVAVTGGALALWLHPVAAQEGCTNISSTETDYDYIVVGSAGGIPVADRLEAGHK
 VLLIEKGPSTGRWGGIMKPEWLIGTNLTRFDVPGLCNQIWAADPTGAICTDQVDMAGCMLG
 GGTA VNA GI.WWKPHPADWDVNFPEGWHSSEMAEATERVFERIPGTTITPSMDGKRYI.SQGF
 45 DMLGGSLAAGWEYLVPNEHPDRKNRTYGHSTFMYSGGERRGGPLATYLVSAVQREGFTLW
 MNTTVTRIIREGGHATGVEVQCSNSEAGQAGIVPLTPKTGRVIVSAGAFGSAKLLFRSGIGPK
 DQLNIVKNSIDGPMISEDQWIELPVGYNLNDHVGTIDIEAHPDVVFYDYYGAWDEPIVEDT
 ERYVANRTGPLAQAAPNIGPIFWETIKGSDGVSRLHQWQARVEGKLNNTSMTITQYLGTSRS
 RGRMTITRRLNNTVSTPPYLRDEYDREAVIQGIANLRESLKGVANLTVITPPSNVTVEFDVDS
 IPATPARRCSNHWIGTAKIGLDDGREGGTSVVDLNTKVVYGTDNIFVVDASIFPGHITGNPSAAI
 VIAAEYAAAKILALPAPEDAAS (SEQ ID NO:7)

50

CDH7:

[0342]

5 MASVDLDQPFDIYIVVGGGTAGLVVANRLSEDSNVRVLVVEAGADRNDPLVLTPLVAGL
 YGKDEYDWNFSSPPQPTLNRRINQARGKMLGGTSGLNFMMLLYPSKGNIDSWAALGNPS
 WNYDALAPYLRFATVHPSQSARDLLGLTYIDESLAAGDGPIQVSHTDGHNVTNKAWLET
 FASLGLEVSTDPDRGKALGAFQNHASIDPATHTRSFAGPAYYTPDVAKRPNLVLTETLVAR
 10 VLFDTAGGEDAVATGVEIITKDGQKKQVSACGEVILAAAGALQSPQIIIEISGVGGREIIEKH
 NIPVVVDNPNVGEHVQDHPVCSFEVADGVPSGDVLRDPNVIQAVVGMYSQGGGAGPIG
 QSVISVAYTPLVDGSGVVSAAEAKAELLARHESSFSTAEGKVLRLDLVESPEATFEFLFPSQV
 DIPENPISMAQYITPVLPENYISVMIFHIIQPFSSRGKVIITSPDIRAAPLWDPRYNSDPLDLELLA
 RGVQFVERIVDSATPFGRVLKQGGKRQPPLRADDLETAREIVRQRQISVFHVSGSCTMRPRD
 15 QGGVVDERLRVYGTRGLRVVDASVFIPIEPVGNIQSVVYAVAERAADLIKEDRAKA (SEQ ID
 NO:8)

20 **EJEMPLO 1**

CEPAS FÚNGICAS Y MÉTODOS

25 [0343] Este ejemplo describe la producción de variantes de la cepa fúngica C1.

Nomenclatura de cepa

30 [0344] La cepa CF-200 (UV18#100fΔalpl) es una cepa derivada de C1. La cepa CF-400 es un derivado de la cepa C1 ("UV18#100fΔalplΔpyr5"), modificada por la eliminación de CDH1, en el que CDH1 comprende la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 1. Las enzimas celulolíticas de estas cepas fueron producidas por fermentación de cultivo líquido sumergido utilizando métodos y un medio de cultivo fúngico adecuado, como se conoce bien en la técnica.

Ensayo GOPOD

35 [0345] Los kits de ensayo GOPOD (Sigma-Aldrich) se utilizan en estos experimentos para medir la cantidad de glucosa producida. En estos experimentos, se añadieron 10 ul de muestra de ensayo a 190 ul de la mezcla de ensayo GOPOD proporcionado en el kit. La reacción se dejó agitar durante 30 min a 50°C. La absorbancia de la solución se midió a 510 nm para determinar la cantidad de glucosa producida. La concentración de glucosa de las muestras se calculó en comparación con los estándares de glucosa (0 a 150 g/L).

EJEMPLO 2

PURIFICACIÓN DE C1 CDH1

45 [0346] En este ejemplo, 400 ml de C1 sobrenadante producido usando los métodos del Ejemplo 1 se concentraron primero a 140 ml usando un evaporador rotatorio. Después, 63 ml del concentrado se intercambió por tampón en tampón MOPS de 20 mM, pH 7,0, utilizando columnas de desalación 4 en línea Hi-Prep 26/10 (GE Healthcare, 17-5087-02). El sobrenadante resultante intercambiado por tampón (~150g/L de proteína total) se cargó en una columna que contiene 500 ml DEAE resina de flujo rápido (GE Healthcare, 17-0709-01) pre-equilibrada con tampón MOPS de 20 mM pH 7,0. La columna se enjuagó con 1 volumen de columna (CV) de MOPS 20 mM (pH 7,0) y después un gradiente de cloruro de sodio 0-300 mM se llevó a cabo en más de 12 volúmenes de columna. Las fracciones se recogieron y se analizaron por geles NuPage® Novex® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen, NP0322BOX). Las bandas de SDS-PAGE correspondientes al peso molecular aparente de CDH1 se analizaron mediante MS (realizado por Alfalisa). El análisis de mapeo en masa confirmó la presencia de CDH1 en las fracciones de elución tardía. Las fracciones que contenían CDH1, como se demuestra por el gel de SDS-PAGE, y se confirmó por MS se reunieron y se concentraron por ultrafiltración usando Sartorius centrífuga de filtro 10 kDa (Sartorius-Stedim, VS2002). A continuación, 10 ml de piperazina 500 mM (pH 5,6) y 45 ml de sulfato de amonio saturado se añadieron al depósito de 45 ml que contiene CDH1 y se cargó la mezcla resultante en un Fenilo FF (alto sub) 16/10 columna (GE Healthcare, 28-9365-45) pre-equilibrada con 1,6 M de sulfato de amonio en piperazina 50 mM, pH 5,6. Un gradiente de 1,6 M a 0 M de sulfato de amonio en piperazina 50 mM, pH 5,6, se llevó a cabo en 30 CV. Las fracciones se recogieron y análisis de gel de SDS-PAGE se realizaron en las fracciones seleccionadas como se describe anteriormente, revelando que CDH1 eluida en la etapa de enjuague final con una pureza de

aproximadamente 80-90%.

[0347] La actividad de CDH1 se midió usando un ensayo de reducción de DCPIP similar al descrito por Schou et. al. (Véase, Schou et al, Biochem J., 330: 565-71 [1998]). En una placa de 96 pocillos de fondo plano transparente a UV, se añadieron fracciones de 50 ml de CDH1 que contienen 150 ml de una solución de 1,0 g/L de celobiosa y DCPIP 100 mM en acetato de sodio 100 mM, pH 5,0. Las muestras se agitaron brevemente a temperatura ambiente y después la absorbancia a 530 nm (A_{530}) se midió durante 10 minutos. Las fracciones C1 que contienen CDH1 muestran una rápida caída en la absorbancia a 530 nm. ensayos DCPIP se realizaron con cantidades variables de glucosa o celobiosa con CDH1 purificada. Diluciones seriadas de celobiosa (1,0 g/L a 7,8 mg/L) se prepararon y glucosa (10 g/L a 78 mg/L) en una placa de poca profundidad de 96 pocillos. Después, se añadieron 20 μ L de glucosa y celobiosa a 160 μ L/pocillo 200 mM DCPIP/ (en 100 mM pH 5,0 de acetato de sodio). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 20 μ L de solución CDH1. La absorbancia a 530 nm se monitorizó durante 30 minutos. Las comparaciones de las tasas de disminución de la absorbancia a 530 nm indican que C1 CDH1 es aproximadamente 10 veces más activo en la celobiosa que la glucosa.

EJEMPLO 3

FABRICACIÓN DE CONSTRUCTOS DE DELECCIÓN DEL MARCADOR ESCINDIDO CDH1

[0348] ADN genómico se aisló de la cepa C1 usando procedimientos estándar. Brevemente, el inóculo de las hifas se sembró en un medio de crecimiento y se dejó crecer durante 72 horas a 35°C. La esterilla micelial se recogió por centrifugación, se lavó, y 50 μ L de tampón de extracción de ADN (200 mM TRIS, pH 8,0; 250 mM NaCl; 125 mM EDTA; 0,5% SDS) se añadió. Los micelios se molieron con un molino cónico, se volvió a extraer con 250 μ L de tampón de extracción, y la suspensión se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que contiene 300 μ L de isopropanol. El ADN se recogió por centrifugación, se lavó dos veces con 70% de etanol, y se diluyó en 100 μ L de agua.

[0349] Los fragmentos de ADN genómico que flanquean el gen *cdh1* fueron clonados utilizando cebadores cf09067 y cf09068 (homología *cdh1* aguas arriba) y cebadores cf09069 y cf09070 (homología *cdh1* aguas abajo). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante el uso de la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando 0,2 uM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos (para homología de aguas arriba) o 53°C durante 30 segundos (para homología de aguas abajo), 72°C durante 1 minuto y extensión final a 72°C durante 5 minutos. El gen *pyre5* se amplificó por PCR como marcador de división de un vector usando cebadores cf09024 y cf09025 (para la porción 5' del gen y cf09026 y cf09027 (para el 3' 5) 'porción del gen). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando 0,2 uM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto y extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3-1. En reacciones de extensión de cadena de solapamiento separado (Véase, Horton et al, Meth Enzymol, 217: 270-279 [1993]), los productos de PCR resultantes de cebadores cf09067 y cf09068 y cebadores cf09026 y cf09027 se fusionaron, al igual que productos PCR resultantes de cebadores cf09069 y cf09070, y los cebadores cf09024 y cf09025. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante el uso de Finnzymes' Phusion® de Polimerasa de ADN siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo 3% de DMSO y utilizando 0,2 uM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 98°C durante 1 minuto, 35 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 62°C durante 20 segundos, 72°C durante 2 minutos y extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de extensión de hebra de solapamiento se utilizaron para la eliminación de *cdh1*.

Tabla 3-1. Nombres de cebadores y secuencias

Nombre de cebador	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
cf09067	CACGCGGGGTTCTTTCTCCATCTC	9
cf09068	TGAGGAAAACGCCGAGACTGAGCTCGACTCTGCCGGCCTACCTACGA	10
cf09069	ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTTTGATGGGGAGTTGAGTTTGTGAA	11
cf09070	GGATGGATGAGGTTGTTTTGAGC	12
cf09024	AACCCACTCGTGACCCAACTGAT	13
cf09025	GACCACGATGCCGGCTACGATACC	14
cf09026	ACATGGCCCCACTCGCTTCTTACA	15

EJEMPLO 4

MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN

[0350] Las células C1 y cepas derivadas se inocularon en 100 ml de medio de cultivo en un matraz de 500 ml Erlenmeyer usando 10^6 esporas/ml. El cultivo se incubó durante 48 horas a 35°C, 250 rpm. Para cosechar los micelios, el cultivo se filtró sobre un filtro de Myracloth estéril (Calbiochem) y se lavó con 100 ml 1700 mosmol solución de NaCl/CaCl₂ (0,6 M NaCl, 0,27 M CaCl₂*H₂O). Los micelios lavados se transfirieron a un tubo de 50 ml y se pesaron. Cailasa (20 mg/gramo de micelio; Cayla) se disolvió en 1700 mosmol NaCl/CaCl₂ y UV-esterilizó durante 90 seg. Después, se añadieron 3 ml de solución de cailasa estéril en el tubo que contiene el micelio lavado y mezclado. Después, se añadieron 15 ml de solución 1700 mosmol de NaCl/CaCl₂ en el tubo y se mezcló. La suspensión de micelio/cailasa se incubó a 30°C, 70 rpm durante 2 horas. Los protoplastos se recogieron por filtración a través de un filtro de Myracloth estéril en un tubo estéril de 50 ml. 25 ml STC frío (1,2 M sorbitol, 50 mM CaCl₂*H₂O, 35 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl) se añadió al flujo y se centrifugó a 2720 rpm durante 10 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 50 ml de STC y se centrifugó de nuevo. Después de las etapas de lavado, el sedimento se resuspendió en 1 ml de STC.

[0351] A continuación, el ADN de 2 µg de cada producto de extensión de solapamiento de hebra se pipeteó en la parte inferior de un tubo estéril de 15 ml y 1 µL de ácido aurintricarboxílico y se añadieron 100 µL de la suspensión de protoplastos. El contenido se mezcló y los protoplastos se incubaron con el ADN a temperatura ambiente durante 25 min. A continuación, 1,7 ml de solución de PEG4000 (60% PEG4000; polietilenglicol, el peso molecular medio de 4000 daltons), 50 mM CaCl₂*H₂O, 35 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl) se añadió y se mezcla bien. La solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min. El tubo se llena de STC, se mezcló y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. El STC se vertió y se resuspendió el sedimento en el STC restante y se sembró en placas de medio selectivo mínimas. Las placas se incubaron durante 5 días a 35°C. Las colonias se volvieron a sembrar y comprobar por la eliminación de *cdh1*; colonias con esta deleción se designaron como cepa "CF-400".

EJEMPLO 5

CONFIRMACIÓN DE DELECIÓN CDH1

[0352] ADN genómico se preparó como se describe en el Ejemplo 3. Las reacciones de PCR se realizaron mediante el uso de la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando 0,2 uM de cada cebador (cebadores cf09112 y cf09113). Las condiciones de amplificación fueron 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y extensión final a 72°C durante 5 minutos. PCR también se llevó a cabo utilizando cebadores cf09110 y cf09111 y polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando 0,2 uM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55,4°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y extensión final a 72°C durante 5 minutos). Estos cebadores se usaron en reacciones de PCR separadas para confirmar la ausencia del gen *cdh1*. Cebadores cf09181 y cf09091 se utilizaron en PCR para confirmar la estructura de unión adecuada y la orientación del constructo marcador *pyr5* (véase la Tabla 5-1). La reacción PCR se realizó utilizando la polimerasa GoTaq® (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando 0,2 uM de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 54,4°C durante 30 segundos, 72°C durante 3 minutos 30 segundos, y extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa para confirmar un patrón de bandas indicativo de deleción *cdh1*.

Tabla 5-1. Primer Names and Sequences		
Nombre de cebador	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
cf09110	AAGCGTGCCGATTTTCCTGATTTTC	16
cf09111	GCATTTCTGGGGCGGTTAGCA	17
cf09112	TCATCGACGCCTCCATCTTCC	18
cf09113	TTTCGGTTGTCGTGTTTCCATTAT	19
cf09181	GGAGATCCTGGAGGATTTCC	20
cf09091	CAGCGGTGTGCGTTATCAAAA	21

[0353] Un ensayo de diclorofenolindofenol colorimétrico (DCPIP) se utilizó para la prueba de supresión de *cdh1* en CF-400. La deleción de *CDH1* se determinó mediante la observación de una disminución de la capacidad para reducir el sustrato DCPIP en comparación con una cepa parental. Las células de la cepa C1 parental y cepa de eliminación de *cdh1* putativo se cultivaron y los sobrenadantes se ensayaron para la actividad DCPIP. En estas pruebas, 160 µl de solución de reactivo DCPIP recién hecha (DCPIP 0,2 mM en acetato de sodio 100 mM, pH 5,0), 20 µl de solución de celobiosa (1 g/L de celobiosa en agua desionizada), y 20 ml de sobrenadante de células sin diluir se combinaron en placas de microtitulación. La absorbancia de la solución se midió inmediatamente con el tiempo a 530 nm en modo cinético durante 30 minutos para realizar un seguimiento de la pérdida de absorbancia como resultado de la reducción de DCPIP. El sobrenadante de cepas que muestran disminución de la capacidad para reducir el sustrato DCPIP se corrieron en SDS-PAGE para confirmar la ausencia de CDH1. Las proteínas de sobrenadantes de cultivo de fermentaciones de cultivo líquido sumergidas de CF-400 y la célula madre no

transformada se separaron por SDS-PAGE utilizando protocolos estándar. Las proteínas se visualizaron por tinción con Simply Blue Safe Stain (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. La proteína Cdh1 se observó como una banda de ~90 kD en la célula madre progenitora no transformada, pero estuvo ausente en la CF-400.

5 EJEMPLO 6

HIDRÓLISIS DE RASTROJO DE MAÍZ

10 **[0354]** En estos experimentos, el rastrojo de maíz de ácido pretratado (NREL) se ajustó por pH a 5,0 con hidróxido
de amonio acuoso. El material era 41,3% de sólidos, con un contenido de humedad de 58,7%. El contenido de
glucano en los sólidos era del 40,7%. El rastrojo de maíz de ácido pretratado se cargó en una placa de 96 pocillos y
se diluyó con tampón de acetato de sodio a un volumen promedio de 110 µl por pocillo con acetato de 128mm de
15 sodio, a un pH 5. La carga de sólidos total era de 24,7% en todos los experimentos y la concentración de glucano
era de 100 g de glucano/kg de reacción. Sobrenadantes de enzimas CF-200 y CF-400 se utilizaron a reacción 3 g de
celulasa/kg. Un conjunto de pocillos de la placa de 96 pocillos también se ha ejecutado en la que se utilizó agua en
lugar de enzima para servir como un control, debido a la presencia de glucosa libre en el sustrato. El nivel de este
control se restó de la concentración de glucosa medida final. Se selló la placa una vez que todos los componentes
de la reacción se añadieron y se colocaron en un agitador a 55°C que gira a 950 rpm durante 73 horas. Al final de la
20 reacción, la placa se dejó enfriar. Las muestras fueron retiradas, diluidas y se analizaron posteriormente por el kit de
ensayo GO (Sigma) para determinar la producción de glucosa. Los resultados se proporcionan en la Figura 2. Como
se indica, el sobrenadante CF-200 genera 52,1 g/l de glucosa, mientras que el sobrenadante CF-400 generó 69,4
g/L de glucosa. El sobrenadante CF-400 exhibió un mayor rendimiento de sacarificación, lo que indica que la
deleción del gen *cdh1* reduce la formación del gluconato a partir de glucosa durante la reacción de sacarificación.

25

Reivindicaciones

- 5 1. Un proceso de fermentación para la producción de una mezcla de enzimas, comprendiendo el procedimiento el cultivo de una célula fúngica en una fermentación de cultivo líquido resultante de la concentración sumergida para producir una mezcla de enzimas, en la que la célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la cantidad de actividad de la deshidrogenasa celobiosa endógena que es secretada por la célula, en la que la célula fúngica es de la familia Chaetomiaceae, en la que dicha célula comprende una delección en el gen de deshidrogenasa celobiosa 1 (*cdh1*), y en el que la célula segrega una mezcla de enzimas que resulta en un rendimiento mejorado de los azúcares fermentables en comparación con una mezcla de enzimas secretadas por una célula fúngica correspondiente antes de o sin la delección en el gen de deshidrogenasa celobiosa 1 (*cdh1*).
- 10 2. El proceso de fermentación de la reivindicación 1, en la que dicha célula fúngica es una especie de *Myceliophthora*.
- 15 3. El proceso de fermentación de la reivindicación 1 o 2, en la que dicha célula fúngica se ha modificado genéticamente para:
 - 20 a) eliminar por lo menos parcialmente un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena.
 - b) interrumpir el péptido señal de secreción de la deshidrogenasa celobiosa;
 - c) reducir la cantidad de la deshidrogenasa celobiosa endógena expresada por la célula y/o interrumpir una secuencia de iniciación de la traducción en la transcripción que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena;
 - 25 d) introducir una mutación en la transcripción que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena; y/o
 - e) reducir el nivel de transcripción de un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena y/o interrumpir el promotor de un gen que codifica la deshidrogenasa celobiosa endógena.
- 30 4. El proceso de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha célula fúngica se ha modificado genéticamente para reducir la eficiencia catalítica de la deshidrogenasa celobiosa endógena.
- 35 5. El proceso de fermentación de la reivindicación 4, en la que uno o más residuos en un sitio activo de la deshidrogenasa celobiosa de dicha célula fúngica se ha modificado genéticamente.
- 40 6. El proceso de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que uno o más residuos en un dominio de unión heme de la deshidrogenasa celobiosa de dicha célula fúngica han sido genéticamente modificados.
- 45 7. El proceso de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicha deshidrogenasa celobiosa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, aproximadamente 88%, aproximadamente 90%, aproximadamente 93%, aproximadamente 95%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% idéntica a SEQ ID NO: 2.
- 50 8. El proceso de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la célula fúngica comprende además una enzima de degradación de la celulosa que es homóloga o heteróloga a dicha célula fúngica.
- 55 9. El proceso de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de enzimas se separa de las células fúngicas tras la fermentación.
- 60 10. El proceso de fermentación de la reivindicación 9, en el que:
 - (a) la fermentación de cultivo líquido sumergido comprende un medio de fermentación que tiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, en el que la fuente de carbono es uno o más de celulosa, celobiosa, sóforosa, xilano, xilosa y xilobiosa;
 - (b) la mezcla de enzimas se separa de las células fúngicas por filtración o centrifugación; y
 - (c) la célula fúngica es una célula *Moceliophthora thermophila*.
- 65 11. Una mezcla de enzimas obtenible por el procedimiento de la reivindicación 10.
12. Un método para generar la glucosa, comprendiendo el procedimiento:
 - a) la producción de una mezcla de enzimas de acuerdo con el proceso de fermentación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y
 - (b) la puesta en contacto de la celulosa con la mezcla de enzimas producida en la etapa (a).

13. El método de la reivindicación 12, que comprende además la fermentación de dicha glucosa a un producto final.

(*M. thermophila* CDH1)

ATGAGGACCTCCTCTCGTTTAAATCGGTGCCCTTGGGGGGCAGCTCTTGCCCGTCTGCCCTTGGCAGAACAAAGCGCCGGTAAC
 CTTACCCGACCCGGACTCGGCATTACCTTCAACACGTGGGTCTCGCGAGGATTCTCCAGACTAAGGGCGGTTTACATTT
 TGGTGTGCTGCTGCCCTGATGCCCCACGACAGACGCCAAGAGTTTCATCGTTACTTGAATGCGCAGAACGATGAGA
 GCGGTTGGTGGGTGCTCCCTGGCGGCCCATGACCAACTCGCTCTCATCGGGCTTGGCCCCACGAGGACACCGTCTA
 CACTCTCCCGTTCGCCACCGGTATGCCATGCCGATGTACAGGGGACGCCAGATCACCCAGGTCTCCTCCTCTG
 TCAACTCGACGCACTTCAAGCTCATCTCAGGTGCGAAGTCCGCAATGGATCAAGCGGGCCACCCGGCGGTGCCCTC
 ACCTCGAACGGCGTGGTCTCGGCTGGTCCAGGCATTGCCGACCCCGCAACCCGACCTGCCCGACCCAGATCACCC
 TCGAGCAGCACGACACGGCATGGTATCTGGGTGCCAGCTCAACTCCGACGCCCGCAGCCCGTCTACACCGAGTGGGC
 CGCCAGGCCACCAAGACCGTCAGGGTACTTGGGGTCCACCGAGACCTCTGTCTGGTGTCCCGTTCGGACGGGG
 GTCCTCGATTACATCGTGGGGGGGTCGCCGTGGCATCCCGCCCGCAGCAAGCTCAGCGAGGCCGGCAAGAGTG
 TGTCTCATCGAAGGGCTTGCCTCGACCCCAACACCGGAGCACTCTCGGCCCGAGTGGCTGAGGGCCACGACCT
 TACCCGCTTGGACTGCCGGGTGTGCAACCAAGATCTGGTTGACTCCAAGGGGATCGTTGCGAGGATACCGACCCAGATGG
 CTGGCTGTCTCGGGGGTACCCGCGTGAATGCCGGCTGTGGTTCAAGCCCTACTCGCTCGACTGGGACTACCTCTTC
 CCTAGTGGTTGGAAGTACAAAGACGTCCAGCCGGCCATCAACCGCCCTCTCGCGCATCCGGGACCCGATGCTCCCTCGAC
 CGACGGCAAGCGCTACTACCAACAGGGCTTCGACGTCTCTCCAAGGGCTGGCGGGCGGGCTGGACCTCGGTACCGGCC
 AATAACGCGCCAGACAAGAAGAACCCGACCTTCTCCCATGCCCTTTCATGTTCCCGGGCGGAGCGCAACGGCCCGCTGG
 GCACCTACTTCCAGACCGCCAAAGAACGCGCAACTTCAAGCTTGGCTCAACACGTCGTCGTCGTCGTCATCCGCCAGGGC
 GGCCACATACCGCGTCGAGGTGAGCCGTTCCGCGACGGCGTTACCAAGGCATCGTCCCGTCAACCAAGTTACGGGCC
 GCGTACTCTCTGCCGGTACCTTTGGCAGTGCAAGATCCTGCTGAGGAGCGGTATCGGTCGCAACGATCAGCTGCAGGTT
 GTCGGGCTCGGAGAAGGATGGCCATCCATGATCAGCAACTCGTCTGGATCAACCTGCCCTGTCCGCTACAACCTGGATGA
 CCACCTCAACACCGACTGTACTCCACCCCGACGTCGTTTACGACTTACGAGGCGTGGGACATCCCATCCAGTC
 TGACAAGGACAGCTACCTCAACTCGGCACGGGCATCCCGCCCAAGCCGCTCCCAACATTGGGCTATGTTCTGGGAAGAGA
 TCAAGGGTGGGACGGCATTTCCGCCAGTCCAGTGGACTGCCGTGTCGAGGGCAGCCTGGTCCCGCCAAACGGCAAGAC
 CATGACCATGCGCAGTACCTCGGTGGTGGTCCACCTCGCGGGCGCATGACCATACCCCGTCCCAGCAACTGTCGTC
 CGGACGTGCCCCTACCTCAAGGACCCCAACGACAAGGAGCCGTCATCCAGGGCATCATCAACCTGCAGAACGCCCTCAAGAAC
 GTCGCCAACCTGACCTGGCTTCCCCAACTCGACCATCACGCCCGCCCAATACGTTGACAGCATGGTCTCCCCGAGCAA
 CCGGGCTCCAAACCTGGATGGGCACCAACAAGATCGGCACCGACGCGGGCGCAAGGGCGGCTCCGCGCTCGTGACCTG
 AACACCAAGGCTACGGCACCGACAACCTCTTCGTCATCGACGCTCCATCTTCCCGGGCTGCCACCAACCCACCTCG
 TACATCGTACGGCGTCGGAGCACGCTCGGCCGATCCTCGCCCTGCCCGAGCTCACGCGGTCGCCAAGTACGGGCGAGT
 GCGGGCCGCGAATGAGCGGCGAGTCTGTCGGCCGACGGCTCCACGTGCCAGATGCAG
 AACGAGTGTACTCGCAGTGCCTTGTGA (SEQ ID NO:1)

FIG. 1

MRTSSRLIGALAAALLPSALAQNNAPVFTTDPDSSGITFNTWGLAEDSPQTKGGFTFGVALPSDALTTDAKEFIGYLKCARNDESGWCG
VSLGGPMTNSLLIAAWPHEDTVYTSR FATGYAMPDVYQQDAEITQVSSSVNSTHFSLIFRCENCLQWSQSGATGGASTSNGVLVLG
WVQAFADPNPTCPDQITLEQHDNMGWGAQLNSDAASPSYTEWAAQATKVTGDCGGPTETSVMGVPVPTGVSFYIWWGGGA
GGIPAADKLEAGKSVLLIEKGFSTANTGGTLGPEWLEGHDLTRFDVPGLCNQIWDKGIACEDTQDMAGCVLGGGTAVNAGLWF
KPYSLDWDYLFPSGWKYKDVQPAINRALSRIPGTDAPSTDKRYYQQGFDVLSKGLAGGGWTSVTANNAPDKKNRTFESHAPFMFAG
GERNGPLGTYFQTAKKRSNFKLWLNTSVKRVIRQGGHITGVEVEPFRDGGYQGIVPVTKVTRVILSAGTFGSAKILLRSGIGPNDQQL
QVVAASEKDGPTMISNSSWINLPVGYNLDDHLNDDTVISHPDVWFYDFYEAWDNPIQSDKDSYLSRGTGILAQAAAPNIGPMFWEEIKG
ADGIVRQLQWRTARVEGSLGAPNGKMTMSQYLGRGATSRGRMTITPSLTTVSDVPYLDKDPNDKEAVIQGIINLQNALKNVANLTLWLF
PNSTITPRQYVDSMVVSPSNRRSNHWMGTNKIGTDDGRKGGSAWDLNLTKVYGTDLNLFVIDASIFPGVPTTNPNTSYIVTASEHASARIL
ALPDLTPVPKYGQCGGREWSGSFVCADGSTCQMNEWYSQCL* (SEQ ID NO:2)

FIG. 1 (Cont.)

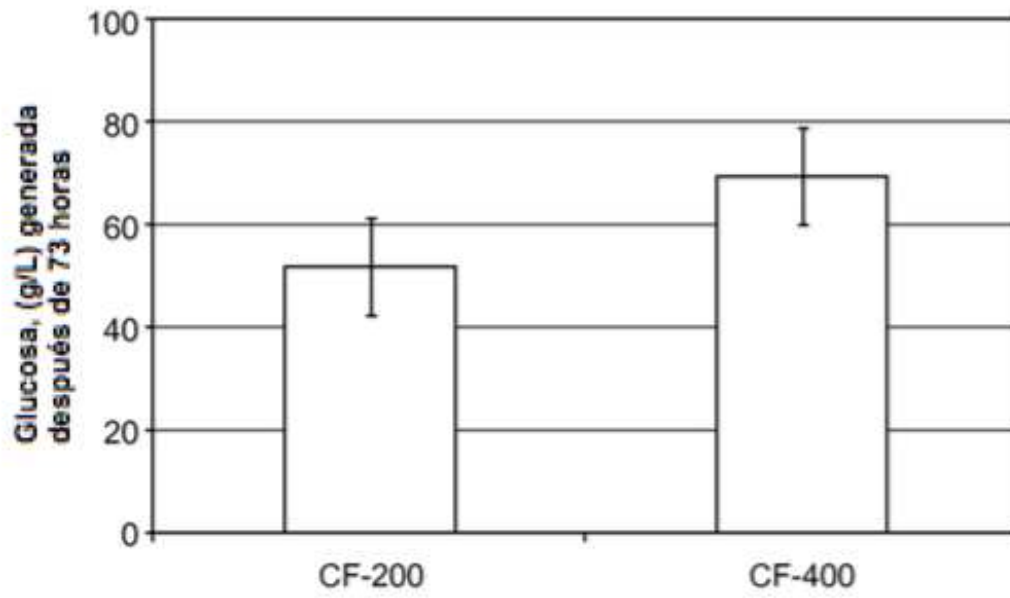


FIG. 2