

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 078**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2010 E 10721090 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2438163**

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

30 Prioridad:

02.06.2009 US 183490 P

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

17.04.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES INC. (50.0%)
1445 Drew Avenue
Davis, CA 95618 , US y
NOVOZYMES A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LIU, YE;
TANG, LAN;
HARRIS, PAUL y
WU, WENPING**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 534 078 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa y polinucleótidos que codifican los mismos

5 Declaración de Derechos de Invenciones realizadas con

la subvención del Gobierno Federal en materia de Investigación y Desarrollo

10 [0001] Esta invención se llevó a cabo con el soporte del gobierno bajo el acuerdo de cooperación DE- FC36-08GO18080 otorgado por el Departamento de Energía. El gobierno posee ciertos derechos sobre la presente invención.

Referencia a un lista de secuencias

15 [0002] Esta solicitud contiene una Lista de Secuencias en un soporte legible por ordenador.

Referencia a un Depósito de Material Biológico

[0003] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito de material biológico.

20 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

25 [0004] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico, vectores, y células huésped que comprenden los polinucleótidos así como a métodos de producción y utilización de los polipéptidos.

Descripción de las Técnicas Relacionadas

30 [0005] La celulosa es un polímero del azúcar simple glucosa enlazado por enlaces beta-1,4. Existen muchos microorganismos que producen enzimas que hidrolizan los glucanos beta-enlazados. Estas enzimas incluyen las endoglucanasas, las celobiohidrolasas, y las beta-glucosidasas. Las endoglucanasas asimilan el polímero de celulosa en localizaciones aleatorias, dejándolo vulnerable a ataques por parte de las celobiohidrolasas. Las celobiohidrolasas liberan secuencialmente moléculas de celobiosa de las extremidades del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero de glucosa hidrosoluble beta-1,4-enlazado. Las beta-glucosidasas hidrolizan la celobiosa en glucosa.

35 [0006] La conversión de materias primas lignocelulósicas en etanol tiene las ventajas de la disponibilidad inmediata de grandes cantidades de materia prima, la conveniencia de que se evita la quema o el envío de los materiales a un vertedero, y el carácter no contaminante del combustible de etanol. Se consideraron la madera, los residuos agrícolas, los cultivos herbáceos y los residuos sólidos urbanos como materias primas para la producción de etanol. Estos materiales consisten principalmente en celulosa, hemicelulosa, y lignina. Una vez que se ha convertido la celulosa en glucosa, se fermenta fácilmente la glucosa en etanol usando levaduras.

40 [0007] Liu y Li sometieron una celobiohidrolasa de la familia 6 de *Chaetomium thermophilum* CT2 en el EMBL/GenBank (UNIPROT: Q4JQF8) con una identidad del 74% y 75% al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4 respectivamente. Zahri et al. sometieron una celobiohidrolasa II de *Trichoderma parceramosum* con una identidad del 64% y 65% al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4 respectivamente.

45 [0008] WO 2004/056981 describe el aislamiento y caracterización de celobiohidrolasas de varios organismos, incluyendo cepas de *Thielavia* en que las secuencias de nucleótido que codifican las celobiohidrolasas tienen hasta un 85% de identidad a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 y SEC ID nº 3.

50 [0009] En la técnica hay la necesidad de mejorar las composiciones de proteína celulolítica a través de la suplementación con enzimas adicionales para aumentar la eficiencia y para proporcionar soluciones enzimáticas rentables para la degradación de la lignocelulosa.

55 [0010] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

60 Resumen de la invención

[0011] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de celobiohidrolasa seleccionados de un polipéptido con al menos un 90% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID n° 2 o de la SEC ID n° 4.

[0012] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención; a células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos; y a métodos de producción de los polipéptidos.

[0013] La presente invención también se refiere a métodos para degradar o convertir un material celulósico, que comprenden: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención.

[0014] La presente invención también se refiere a métodos para producir un producto de fermentación, que comprenden:

(a) sacarificar un material celulósico con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención;

(b) fermentar el material celulósico sacarificado con uno o varios microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y

(c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.

[0015] La presente invención también se refiere a métodos para la fermentación de un material celulósico, que comprenden: la fermentación del material celulósico con uno o varios microorganismos fermentadores, en la que se sacarifica el material celulósico con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

[0016]

La Figura 1 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de un gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 (SEC ID n° 1 y 2, respectivamente).

La Figura 2 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de un gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 (SEC ID n° 3 y 4, respectivamente).

La Figura 3 muestra un mapa de restricción de pCBHII45178.

La Figura 4 muestra un mapa de restricción de pGEM-T-CBHII45178.

La Figura 5 muestra un mapa de restricción de pCBHII45097.

La Figura 6 muestra un mapa de restricción de pGEM-T-CBHII45097.

La Figura 7 muestra los perfiles de actividad pH de la *Thielavia hyrcaniae* NN045097 y de celobiohidrolasas NN045178 a 50°C.

Las Figuras 8A y 8B muestran la estabilidad de las celobiohidrolasas de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 y NN045178 como una función del pH a 50°C.

La Figura 9 muestra los perfiles de actividad de temperatura de las celobiohidrolasas de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 y NN045178 a pH 5.

Las Figuras 10A y 10B muestran la estabilidad de las celobiohidrolasas de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 y NN045178 como una función de la temperatura a pH 5.

Definiciones

[0017] **Celobiohidrolasa:** el término "celobiohidrolasa" significa una celobiohidrolasa 1,4-beta-D-glucano (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, en los celooligosacáridos, o en cualquier glucosa beta-1,4-enlazada que contenga polímero, y libera celobiosa de los extremos reductores y no reductores de la cadena (Teeri, 1997, Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology 15: 160-167 ; Teeri et al., 1998, Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178). Para los propósitos de la presente invención, la actividad de celobiohidrolasa se determina según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters, 149: 152-156; van Tilbeurgh y Claeysens, 1985, FEBS Letters, 187: 283-288; y Tomme et al., 1988, Eur. J. Biochem. 170: 575-581. Se puede emplear el método de Lever et al. para evaluar la hidrólisis de la celulosa en rastrojo de maíz, mientras que se pueden utilizar los métodos de van Tilbeurgh et al. y de Tomme et al. para determinar la actividad de celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente, 4-metilumbeliferil-β-D-lactósido. Además, se puede usar la celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC por sus siglas en inglés) como un sustrato como se describe en el presente documento.

[0018] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos un 20%, por ejemplo al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, y al menos un 100% de la actividad de celobiohidrolasa del polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4.

5 [0019] **Familia 6, GH6, o CEL6:** los términos "Familia 6", "GH6" o "CEL6" se definen en el presente documento como un polipéptido que forma parte de la familia de glucósido hidrolasas 6, según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat y Bairoch, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

10 [0020] **Enzima celulolítica o celulasa:** el término "enzima celulolítica" o "celulasa" significa una o más enzimas (diferentes) que hidrolizan un material celulósico. Esas enzimas incluyen endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s), beta-glucosidasa(s), o combinaciones de las mismas. Los dos métodos básicos para medir la actividad celulolítica incluyen: (1) medir la actividad celulolítica total, y (2) medir las actividades celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas) como analizados en Zhang et al., Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481. Se mide la actividad celulolítica total usando sustratos insolubles, incluyendo papel de filtro Whatman Nº1, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa algal, algodón, lignocelulosa pretratada, etc. El ensayo de la actividad celulolítica total más común es el ensayo de papel de filtro que usa papel de filtro Whatman Nº1 como sustrato. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) estableció el ensayo (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

20 [0021] Para los propósitos de la presente invención, se determina la actividad enzimática celulolítica a través de la medición del aumento en la hidrólisis de un material celulósico por enzima(s) celulolítica(s) bajo las siguientes condiciones: 1-20 mg de proteína de enzima celulolítica/g de celulosa en rastrojo de maíz pretratado (PCS por sus siglas en inglés) durante 3-7 días a 50°C en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína de enzima celulolítica. Las condiciones normales son reacciones de 1 ml, PCS lavado o no lavado, 5% de sólidos insolubles, 50 mM de acetato sódico a pH 5, 1 mM MnSO₄, 50 a 65°C, 72 horas, análisis del azúcar usando una columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.).

30 [0022] **Endoglucanasa:** el término "endoglucanasa" significa una endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.4), que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, derivados de celulosa (como por ejemplo carboximetilcelulosa y hidroxietilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en glucanos beta-1,3 mezclados como por ejemplo beta-D-glucanos de cereales o xiloglucanos, y otros materiales vegetales que contienen componentes celulósicos. Se puede determinar la actividad de endoglucanasa a través de la medición de la reducción en la viscosidad del sustrato o del aumento en los extremos reductores determinado por un ensayo de reducción de azúcar (Zhang et al., 2006; Biotechnology Advances 24: 452-481). Para los fines de la presente invención, se determina la actividad de endoglucanasa usando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato según el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268, a pH 5, 40°C.

40 [0023] **Beta-glucosidasa:** el término "beta-glucosidasa" significa una actividad de beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de residuos terminales no-reductores de beta-D-glucosa con la liberación de beta-D-glucosa. Celobiasa es sinónimo de beta-glucosidasa. Para los fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa se determina a 25°C usando 1 mM 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato en 50 mM citrato de sodio a pH 4,8. Se define una unidad de actividad de beta-glucosidasa como 1,0 µmol de anión de *p*-nitrofenolato producido por minuto a 25°C, pH 4,8.

50 [0024] **Actividad de aumento celulolítico:** el término "actividad de aumento celulolítico" significa una actividad biológica catalizada por un polipéptido GH61 que potencia la hidrólisis de un material celulósico por enzimas con actividad celulolítica. Para los fines de la presente invención, se determina la actividad de aumento celulolítico a través de la medición del aumento de los azúcares reductores o del aumento de la celobiosa y glucosa total de la hidrólisis de un material celulósico por parte de una enzima celulolítica bajo las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína total/g de celulosa en PCS, donde la proteína total está compuesta por 50-99,5% p/p de proteína de enzima celulolítica y 0,5-50% p/p de proteína de un polipéptido GH61 con actividad de aumento celulolítico durante 1-7 días a 50°C en comparación con una hidrólisis de control con una carga total de proteína igual y sin actividad de aumento celulolítico (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS). En un aspecto preferido se usa como la fuente de la actividad celulolítica, una mezcla de CELLULAST® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) en presencia de 2-3% del peso total de proteína de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (producida de forma recombinante en *Aspergillus oryzae* según WO 02/095014) o 3% del peso total de proteína de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (producida de forma recombinante en *Aspergillus oryzae* como se describe en WO 2002/095014) de la carga de proteína de celulasa.

60 [0025] Los polipéptidos GH61 con actividad de aumento celulolítico mejoran la hidrólisis de un material celulósico

catalizado por enzimas con actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzimas celulolíticas necesarias para alcanzar el mismo grado de hidrólisis, preferiblemente al menos 1,01 veces, más preferiblemente al menos 1,05 veces, más preferiblemente al menos 1,10 veces, más preferiblemente al menos 1,25 veces, más preferiblemente al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces y aún más preferiblemente al menos 20 veces.

[0026] **Glucósido hidrolasa de la familia 61:** el término "glucósido hidrolasa de la familia 61" o "familia GH61" o "GH61" significa un polipéptido que forma parte de la familia 61 de las glucósido hidrolasas según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, *Biochem. J.* 280: 309-316, y Henrissat B., y Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochem. J.* 316: 695-696.

[0027] **Enzima hemicelulolítica o hemicelulasa:** el término "enzima hemicelulolítica" o "hemicelulasa" significa una o más enzimas (diferentes) que hidrolizan un material hemicelulósico. Ver, por ejemplo, Shallom, D. y Shoham, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion In Microbiology*, 2003, 6(3): 219-228). Las hemicelulasas son componentes fundamentales en la degradación de la biomasa vegetal. Algunos ejemplos de hemicelulasas incluyen, pero no se limitan a, una esterasa de acetilmanano, una esterasa de acetixilano, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronilo, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa. Los sustratos de estas enzimas, las hemicelulosas, son un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados y lineales que se ligan a través de enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa en la pared celular vegetal, transformándolas en una red robusta a través de reticulación. Las hemicelulosas están además unidas covalentemente a la lignina, formando junto con la celulosa una estructura altamente compleja. Para degradar completamente la estructura y organización variable de las hemicelulosas es necesaria la acción conjunta de muchas enzimas. Los módulos catalíticos de las hemicelulasas son las glucósido hidrolasas (GHs) que hidrolizan los enlaces glucosídicos, o las carbohidrato esterases (CEs), que hidrolizan enlaces de éster de las cadenas laterales de acetato o de ácido ferúlico. Se pueden asignar estos módulos catalíticos, basados en la homología de sus secuencias primarias, a las familias GH y CE marcadas con números. Algunas familias, con un pliegue similar a nivel global, se pueden reagrupar en clanes marcados alfabéticamente (por ejemplo, GH-A). Está disponible una clasificación muy informativa y actualizada de estas y otras enzimas activas de carbohidratos en la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZy por sus siglas en inglés). Se pueden medir las actividades de enzimas hemicelulolíticas según Ghose y Bisaria, 1987, *Pure & Appl. Chem.* 59: 1739-1752.

[0028] **Actividad de degradación del xilano o actividad xilanolítica:** el término "actividad de degradación del xilano" o "actividad xilanolítica" significa una actividad biológica que hidroliza material que contiene xilano. Los dos métodos básicos para la medición de la actividad xilanolítica incluyen: (1) la medición de la actividad xilanolítica total, y (2) la medición de las actividades xilanolíticas individuales (por ejemplo, endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, acetilxilano esterases, feruloil esterases, y alfa-glucuronilo esterases). Se resumieron los avances recientes en ensayos de enzimas xilanolíticas en diferentes publicaciones incluyendo Biely y Puchard, Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes, 2006, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(11): 1636-1647; Spanikova y Biely, 2006, Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by *Schizophyllum commune*, *FEBS Letters* 580(19): 4597-4601 ; Herrmann, Vrsanska, Jurickova, Hirsch, Biely y Kubicek, 1997, The beta-D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase, *Biochemical Journal* 321: 375-381.

[0029] Se puede medir la actividad de degradación total del xilano a través de la determinación de los azúcares reductores formados de los varios tipos de xilanos, incluyendo, por ejemplo, xilanos de glumilla de avena, de madera de haya, y de madera de alerce, o a través de la determinación fotométrica de los fragmentos de xilano teñidos liberados de varios xilanos teñidos covalentemente. El ensayo de actividad xilanolítica total más común se basa en la producción de azúcares reductores de glucuronoxilano 4-O-metilo polimérico como se describe en Bailey, Biely, Poutanen, 1992, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, *Journal of Biotechnology* 23(3): 257- 270 .

[0030] Para los fines de la presente invención, se determina la actividad de degradación del xilano midiendo el aumento en la hidrólisis de xilano de madera de abedul (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, MO, EE.UU.) por parte de la(s) enzima(s) que degradan el xilano bajo las siguientes condiciones normales: 1 ml reacciones, 5 mg/ml sustrato (sólidos totales), 5 mg proteína xilanolítica/g de sustrato, 50 mM acetato sódico a pH 5, 50°C, 24 horas, análisis de azúcar usando el ensayo de hidrácido de ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBAH por sus siglas en inglés) como describió Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, *Anal. Biochem* 47: 273- 279.

[0031] **Xilanasa:** el término "xilanasa" significa una 1,4-beta-D-xilano-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endo-hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos. Para los fines de la presente invención, se determina la actividad xilanolítica usando 0,2% de arabinoxilano reticulado con azurina (AZCL) como sustrato en 0,01% de Triton X-100 y 200

mM tampón de fosfato de sodio a pH 6 a 37°C. Se define una unidad de actividad de xilanasas como 1,0 µmol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6 a partir de 0.2% de arabinoxilano AZCL como sustrato en 200 mM de tampón de fosfato de sodio a pH 6.

[0032] **Beta-xilosidasa:** el término "beta-xilosidasa" significa una xilohidrolasa beta-D-xilósido (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exohidrólisis de los beta (1→4)-xilooligosacáridos cortos, para eliminar los residuos sucesivos de D-xilosa de los terminales no reductores. Para los fines de la presente invención, se define una unidad de beta-xilosidasa como 1,0 µmol de anión de *p*-nitrofenolato producido por minuto a 40°C, pH 5 a partir de 1 mM de *p*-nitrofenilo-beta-D-xilósido como sustrato en 100 mM citrato de sodio que contiene 0,01% de TWEEN® 20.

[0033] **Acetilxilano esterasa:** el término "acetilxilano esterasa" significa una carboxilesterasa (EC 3.1.1.72) que cataliza la hidrólisis de grupos de acetilo de xilano polimérico, de xilosa acetilada, de glucosa acetilada, de acetato de alfa-naftilo, y de acetato de *p*-nitrofenilo. Para los fines de la presente invención, se determina la actividad de la acetilxilano esterasa usando 0,5 mM de *p*-nitrofenilacetato como sustrato en 50 mM acetato sódico a pH 5,0 que contiene 0,01% de TWEEN™ 20. Se define una unidad de acetilxilano esterasa como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de anión de *p*-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0034] **Feruloil esterasa:** el término "feruloil esterasa" significa una 4-hidroxi-3-metoxycinamoilo-azúcar hidrolasa (EC 3.1.1.73) que cataliza la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxycinamoilo (feruloil) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en sustratos "naturales", para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxycinamato). También se conoce la feruloil esterasa como esterasa de ácido ferúlico, hidroxycinamoilo esterasa, FAE-III, cinamoil éster hidrolasa, FAEA, cinnAE, FAE-I, o FAE-II. Para los fines de la presente invención, se determina la actividad de la feruloil esterasa usando 0,5 mM de *p*-nitrofenilferulato como sustrato en 50 mM acetato sódico a pH 5,0. Una unidad de feruloil esterasa es igual a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de anión de *p*-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0035] **Alfa-glucuronidasa:** el término "alfa-glucuronidasa" significa una alfa-D-glucosiduronato glucuronohidrolasa (EC 3.2.1.139) que cataliza la hidrólisis de alfa-D-glucuronosida en D-glucuronato y un alcohol. Para los fines de la presente invención, se determina la actividad de alfa-glucuronidasa según de Vries, 1998, J. Bacteriol. 180: 243-249. Una unidad de alfa-glucuronidasa es igual a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico por minuto a pH 5, 40°C.

[0036] **Alfa-L-arabinofuranosidasa:** el término "alfa-L-arabinofuranosidasa" significa una alfa-L-arabinofuranosida arabinofuranohidrolasa (EC 3.2.1.55) que cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores de alfa-L-arabinofuranosida en alfa-L-arabinósidos. La enzima actúa sobre alfa-L-arabinofuranosidas, alfa-L-arabinanos que contienen enlaces (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. También se conoce la alfa-L-arabinofuranosidasa como arabinosidasa, alfa-arabinosidasa, alfa-L-arabinosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, polisacárido alfa-L-arabinofuranosidasa, alfa-L-arabinofuranosida hidrolasa, L-arabinosidasa, o alfa-L-arabinanasa. Para los fines de la presente invención, se determina la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa usando 5 mg arabinoxilano de trigo con viscosidad media (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irlanda) por ml de 100 mM acetato sódico a pH 5 en un volumen total de 200 µl durante 30 minutos a 40°C llevando a cabo en seguida el análisis de arabinosa a través de cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.).

[0037] **Material celulósico:** el material celulósico puede ser cualquier material que contenga celulosa. El polisacárido predominante en la pared celular primaria de la biomasa es la celulosa, el segundo más abundante es la hemicelulosa y el tercero es la pectina. La pared celular secundaria, producida después de que la célula haya dejado de crecer, también contiene polisacáridos y se ve reforzada a través de la lignina polimérica reticulada covalentemente a la hemicelulosa. La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y por lo tanto un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras que las hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, como por ejemplo xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos y mananos en estructuras complejas ramificadas con una gama de sustituyentes. Aunque generalmente es polimorfa, la celulosa se encuentra en tejido vegetal principalmente como una matriz cristalina insoluble de cadenas de glucano paralelas. Las hemicelulosas se unen normalmente a la celulosa a través de enlaces de hidrógeno, al igual que a otras hemicelulosas, que ayudan a estabilizar la matriz de la pared celular.

[0038] La celulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, cáscaras, farfollas y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de los árboles. El material celulósico puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, papel usado, y residuos de fábricas de pulpa y de papel (ver, por ejemplo, Wiseloge et al., 1995, in Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp.105-118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695- 719; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23-40, Springer-Verlag, New York). Se entiende en el presente documento que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un

material de la pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mixta. En un aspecto preferido, el material celulósico es lignocelulosas, que comprende celulosa, hemicelulosa, y lignina.

- 5 [0039] En un aspecto, el material celulósico es un material herbáceo. En otro aspecto, el material celulósico son residuos agrícolas. En otro aspecto, el material celulósico son residuos de silvicultura. En otro aspecto, el material celulósico son residuos sólidos municipales. En otro aspecto, el material celulósico es papel usado. En otro aspecto, el material celulósico son residuos de fábricas de pulpa y de papel.
- 10 [0040] En otro aspecto, el material celulósico es rastrojo de maíz. En otro aspecto, el material celulósico es fibra de maíz. En otro aspecto, el material celulósico es mazorca de maíz. En otro aspecto, el material celulósico es cáscara de naranja. En otro aspecto, el material celulósico es paja de arroz. En otro aspecto, el material celulósico es paja de trigo. En otro aspecto, el material celulósico es pasto varilla. En otro aspecto, el material celulósico es el miscanthus. En otro aspecto, el material celulósico es bagazo.
- 15 [0041] En otro aspecto, el material celulósico es celulosa microcristalina. En otro aspecto, el material celulósico es celulosa bacteriana. En otro aspecto, el material celulósico es celulosa algal. En otro aspecto, el material celulósico es linter de algodón. En otro aspecto, el material celulósico es celulosa amorfa tratada con ácido fosfórico. En otro aspecto, el material celulósico es papel de filtro.
- 20 [0042] Se puede utilizar el material celulósico en el estado en que se encuentra o se lo puede someter a pretratamiento, usando métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en el presente documento. En un aspecto preferido, se pretrata el material celulósico.
- 25 [0043] **Rastrojo de maíz pretratado:** el término "Rastrojo de Maíz Pretratado" o "PCS" (por sus siglas en inglés) significa un material celulósico obtenido del rastrojo de maíz a través del tratamiento con calor y ácido sulfúrico diluido.
- 30 [0044] **Aislado o purificado:** el término "aislado o purificado" significa que un polipéptido o polinucleótido se elimina de al menos un componente con el cual está naturalmente asociado. Por ejemplo, un polipéptido puede ser al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro, o al menos 95% puro, como determinado por electroforesis en gel de poliácridamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) y un polinucleótido puede ser al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro, o al menos 95% puro, como se determina por electroforesis de agarosa.
- 35 [0045] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualesquiera modificaciones postraduccionales, tal como procesamiento del N-terminal, el truncamiento del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos 18 a 493 de la SEC ID nº 2 con base en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 17 de la SEC ID nº 2 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos 18 a 487 de la SEC ID nº 4 con base en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, *supra*) que predice que los aminoácidos 1 a 17 de la SEC ID nº 4 son un péptido señal. Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresado por el mismo polinucleótido.
- 40 [0046] **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de celobiohidrolasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 52 a 1595 de la SEC ID nº 1 basados en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, *supra*) que predice que los nucleótidos 1 a 51 de la SEC ID nº 1 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 52 a 1581 de la SEC ID nº 3 basados en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, *supra*) que predice que los nucleótidos 1 a 51 de la SEC ID nº 3 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es la secuencia de ADNc presente en los nucleótidos 52 a 1595 de la SEC ID nº 1. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es la secuencia de ADNc presente en los nucleótidos 52 a 1595 de la SEC ID nº 3.
- 45 [0047] **Identidad de secuencia:** el parámetro "identidad de secuencia" describe la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos.
- 50 [0048] Para los fines de la presente invención, se determina el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los
- 60

parámetros opcionales usados son una penalización para la apertura de gap de 10, penalización de 0,5 para la extensión del gap y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS del BLOSUM62). El resultado del Needle marcado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento - Número total de gaps en el alineamiento)

[0049] Para los fines de la presente invención, se determina el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótido utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *supra*), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son una penalización para la apertura de gap de 10, penalización para la extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS del NCBI NUC4.4). El resultado del Needle marcado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento - Número total de gaps en el alineamiento)

[0050] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más aminoácidos (diferentes) eliminados del amino-terminal y/o carboxi-terminal de un polipéptido maduro; en el cual el fragmento tiene actividad de celobiohidrolasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 400 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 425 residuos de aminoácidos, y aún más preferiblemente al menos 450 residuos de aminoácidos, del polipéptido maduro de la SEC ID n° 2. En otro aspecto, un fragmento contiene al menos 400 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 425 residuos de aminoácidos, y aún más preferiblemente al menos 450 residuos de aminoácidos, del polipéptido maduro de la SEC ID n° 4.

[0051] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más nucleótidos (diferentes) eliminados del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; en el cual la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de celobiohidrolasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1200 nucleótidos, más preferiblemente al menos 1275 nucleótidos, y aún más preferiblemente al menos 1350 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n° 1. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1200 nucleótidos, más preferiblemente al menos 1275 nucleótidos, y aún más preferiblemente al menos 1350 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n° 3.

[0052] **Variante alélica:** El término "variante alélica" significa cualquier de la dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede causar polimorfismo en las poblaciones. Las mutaciones del gen pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0053] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante son generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos como por ejemplo GTG y TTG y extremos con un codón de terminación como por ejemplo, TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser ADN, ADNc, sintética, o un polinucleótido recombinante.

[0054] **ADNc:** El término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar a través de transcripción inversa de una molécula de ARNm madura empalmada obtenida de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias de intrón que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción inicial de ARN primario es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo el empalme, antes que aparezca como ARNm maduro empalmado.

[0055] **Constructo de ácidos nucleicos:** el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien unicatenaria o bien bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos que de otra forma no existirían en la naturaleza o que es sintético. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control necesarias para expresar la secuencia codificante de la presente invención.

[0056] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" significa todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de

péptido señal, y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y las señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden disponer de enlaces para introducir sitios de restricción específicos que facilitan la ligadura de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0057] **Enlazado operativamente:** El término "enlazado operativamente" significa una configuración en la que se coloca una secuencia de control en una posición apropiada en relación a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0058] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0059] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está enlazada operativamente a nucleótidos adicionales que posibilitan su expresión.

[0060] **Célula huésped:** el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible a transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurrieron durante la replicación.

[0061] **Variante:** el término "variante" significa un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más posiciones (diferentes). Una sustitución significa sustituir un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir uno o más aminoácidos (diferentes), por ejemplo, 1-5 aminoácidos, adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa

[0062] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de celobiohidrolasa seleccionados de un polipéptido con al menos un 90% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4.

[0063] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con una identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4 de al menos un 90%, por ejemplo al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100%, con actividad de celobiohidrolasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren del polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4 en no más de diez aminoácidos, por ejemplo, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos y en un aminoácido.

[0064] Un polipéptido de la presente invención comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de celobiohidrolasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en la SEC ID nº 2. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID nº 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 18 a 493 de la SEC ID nº 2.

[0065] Un polipéptido de la presente invención también comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 4 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de celobiohidrolasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en la SEC ID nº 4. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID nº 4. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 18 a 487 de la SEC ID nº 4.

[0066] La presente divulgación también se refiere a polipéptidos aislados con actividad de celobiohidrolasa que son codificados por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3, (ii) la secuencia de ADNc presente en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3, o (iii) la cadena complementaria de (i) o (ii) en toda su longitud (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York).

[0067] Se puede utilizar el polinucleótido de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3 o una subsecuencia del mismo, así como la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4 o un fragmento de la misma para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos que codifican ADN con actividad de celobiohidrolasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos muy conocidos en la técnica. En particular, esas sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o de la especie de interés, siguiendo los procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente. Esas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían tener una longitud de al menos 14, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos una longitud de 900 nucleótidos. Se puede usar tanto el ADN con el ARN. Las sondas son normalmente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina, o avidina).

[0068] Se puede examinar una genoteca de ADN genómico o de ADNc obtenida a partir de esas otras cepas en busca de ADN que hibrida con las sondas descritas anteriormente y codifica un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa. Se puede separar el ADN genómico u otro ADN de esas otras cepas mediante electroforesis en gel de poliácridamida o agarosa, u otras técnicas de separación. Se puede transferir a e inmovilizar el ADN de las genotecas o el ADN separado en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que es homólogo a la SEC ID nº 1 o a la SEC ID nº 3 o es una subsecuencia de la misma, se usa preferiblemente el material portador en una transferencia de Southern.

[0069] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3; a la secuencia de ADNc presente en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3; a su cadena complementaria en toda su longitud; o a una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia muy bajas hasta condiciones de astringencia altísimas. Se pueden detectar las moléculas a las que la sonda de ácido nucleico se hibrida bajo estas condiciones usando, por ejemplo, película radiográfica.

[0070] En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3 o la secuencia de ADNc del mismo. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4 o un fragmento del mismo. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 o la secuencia de ADNc de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es el polinucleótido contenido en el plásmido pGEM-T-CBHII45097 que está presente en *E. coli* DSM 22598, donde el polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es la región codificante del polipéptido maduro presente en el plásmido pGEM-T-CBHII45097 que está presente en *E. coli* DSM 22598. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es el polinucleótido presente en el plásmido pGEM-T-CBHII45178 que está presente en *E. coli* DSM 22599, donde el polinucleótido codifica un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es la región codificante del polipéptido maduro presente en el plásmido pGEM-T-CBHII45178 que está presente en *E. coli* DSM 22599.

[0071] Para sondas largas con una longitud de al menos 100 nucleótidos, se definen desde condiciones de astringencia muy bajas hasta condiciones de astringencia altísimas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 25% de formamida para astringencias muy bajas y bajas, o 35% de formamida para astringencias medias y medias-altas, o 50% de formamida para astringencias altas o altísimas, siguiendo los procedimientos de transferencia de Southern estándar idealmente durante 12 a 24 horas. Se lava finalmente el material portador, tres veces cada uno, durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% SDS a 45°C (astringencia muy baja), a 50°C (astringencia baja), a 55°C (astringencia media), a 60°C (astringencia media-alta), a 65°C (astringencia alta), y a 70°C (astringencia altísima).

[0072] Para sondas cortas con una longitud de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos, se definen las condiciones de astringencia como prehibridación e hibridación a alrededor de 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculada utilizando el cálculo de Bolton y McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl a pH 7,6, 6 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato de sodio monobásico, 0,1 mM ATP, y 0,2 mg ARN de levadura por ml siguiendo los procedimientos de transferencia de Southern estándar durante idealmente 12 a 24 horas. Se lava finalmente el material portador una vez en 6X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos usando 6X SSC a entre 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

[0073] La presente divulgación también se refiere a polipéptidos aislados con actividad de celobiohidrolasa codificados por polinucleótidos con una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3 o la secuencia de ADNc de la misma de al menos en un 90%, por ejemplo, al menos en un 91%, al

ES 2 534 078 T3

menos en un 92%, al menos en un 93%, al menos en un 94%, al menos en un 95%, al menos en un 96%, al menos en un 97%, al menos 98%, al menos en un 99%, o en un 100%.

[0074] La presente divulgación también se refiere a variantes que comprenden una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4, o una secuencia homóloga del mismo. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son pequeños cambios, es decir sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; pequeñas delecciones, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de los amino-terminales o carboxi-terminales, como por ejemplo un residuo de metionina de terminal amino; un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20 a 25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga de red u otra función, como por ejemplo el tracto de polihistidina, un epitopo antigénico o un dominio de unión.

[0075] Algunos ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R. L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, New York. Los cambios que ocurren más frecuentemente 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.

[0076] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH ideal, y tener otros efectos similares.

[0077] Se pueden identificar los aminoácidos esenciales en un polipéptido original según procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis mediante alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introduce una única mutación de alanina en cada residuo de la molécula, y se examinan las moléculas mutantes resultantes en busca de actividad de celobiohidrolasa para identificar los residuos de aminoácido que son esenciales para la actividad de la molécula. Ver también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. Se puede también determinar el sitio activo de la enzima u otra interacción biológica mediante el análisis físico de la estructura, como viene determinado por técnicas como por ejemplo resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones, o marcaje por fotoafinidad, en conjunto con mutaciones de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Se puede también inferir las identidades de los aminoácidos esenciales a partir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con el polipéptido original.

[0078] Se pueden llevar a cabo las sustituciones, delecciones, y/o inserciones de aminoácidos únicas o múltiples usando métodos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguidos por un procedimiento de detección pertinente, como por ejemplo los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propenso a error (error-prone PCR), presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; Patente estadounidense nº 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis de región dirigida (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

[0079] Se pueden combinar los métodos de mutagénesis/redistribución con métodos de selección automatizados de alto rendimiento, para detectar la actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican los polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar de la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de los residuos individuales de aminoácidos en un polipéptido.

[0080] El número total de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones del polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o de la SEC ID nº 4 no es superior a 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.

[0081] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el cual una parte de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o en el C-terminal de una parte de otro polipéptido.

[0082] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido con una fusión escindible en el que otro polipéptido está fusionado en el N-terminal o en el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Se produce un

polipéptido de fusión mediante la fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para la producción de polipéptidos fusionados son conocidas en la técnica, e incluyen la ligadura de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos para que estén en el marco y para que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control de los mismos promotor(es) y del terminador. Las proteínas de fusión también se pueden crear utilizando tecnología intein en la cual se crean fusiones post-traduccionales (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776- 779).

[0083] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Algunos ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero no se limitan a, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen- Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

Fuentes de polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa

[0084] Se puede obtener un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtener a partir de" como se utiliza en el presente documento en conjunto con determinada fuente debe significar que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por una fuente o una cepa, en la cual se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el polipéptido que se obtiene a partir de determinada fuente se secreta extracelularmente.

[0085] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo como por ejemplo un polipéptido de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, o *Streptomyces* con actividad de celobiohidrolasa, o un polipéptido bacteriano gram negativo como por ejemplo un polipéptido de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, o *Ureaplasma*.

[0086] En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*.

[0087] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0088] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans*.

[0089] El polipéptido también puede ser un polipéptido fúngico. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*; o un polipéptido fúngico filamentoso como por ejemplo un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria*.

[0090] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis*.

[0091] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium*

sulphureum, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Ipex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia speditonum*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0092] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Thielavia hyrcaniae* con actividad de celobiohidrolasa, por ejemplo, un polipéptido que se obtuvo de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 o de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 (CGMCC 0864).

[0093] Se entenderá que para las especies mencionadas anteriormente la invención abarcan tanto los estados perfectos como los imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por lo cual se conocen. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

[0094] El público puede acceder fácilmente a cepas de estas especies en varias colecciones de cultivos, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0095] El polipéptido puede identificarse y obtenerse de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas anteriormente. Se conocen en la técnica técnicas para el aislamiento de microorganismos de hábitats naturales. El polinucleótido que codifica el polipéptido puede así obtenerse examinando una genoteca de ADN genómico o de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclada. Una vez se detecta un polinucleótido que codifica un polipéptido con la sonda(s), se puede aislar o clonar el polinucleótido utilizando las técnicas que los expertos en la técnica conocen muy bien (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Polinucleótidos

[0096] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención.

[0097] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido son conocidas en la técnica e incluyen aislarlo del ADN genómico, prepararlo usando ADNc, o una combinación de los mismos. Se puede llevar a cabo la clonación de los polinucleótidos de dicho ADN genómico usando, por ejemplo, la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) o selección de anticuerpos de una biblioteca de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico como por ejemplo reacción en cadena de la ligasa (LCR por sus siglas en inglés), transcripción activada por ligadura (LAT por sus siglas en inglés) y amplificación basada en polinucleótidos (NASBA por sus siglas en inglés). Se pueden clonar los polinucleótidos a partir de una cepa de *Thielavia*, o de otro organismo o de un organismo relacionado y por lo tanto, puede ser, por ejemplo, una variante alélica o de especie de la región codificante del polipéptido del polinucleótido.

[0098] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o que consisten en polinucleótidos con un grado de identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3, o a la secuencia de ADNc del mismo, de al menos un 90%, por ejemplo, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100%, que codifican un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa.

[0099] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos esencialmente similares al polipéptido. El término "esencialmente similar" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que no ocurren naturalmente. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera modificada del polipéptido aislado a partir de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH ideal, o en otros aspectos similares. Se puede construir la variante basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3 o en la secuencia de ADNc del mismo, por ejemplo, una subsecuencia del mismo, y/o introduciendo sustituciones del nucleótido que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o introduciendo sustituciones de nucleótido que

pueden originar una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de la sustitución de nucleótidos, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0100] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polinucleótidos de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o de la SEC ID nº 3, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de la misma (Sambrook et al., 1989, *supra*), tal y como se define en el presente documento.

[0101] En un aspecto, el polinucleótido comprende o consiste en la SEC ID nº 1, la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1, o la secuencia presente en el plásmido pGEM-T- CBHII45097 que está presente en *E. coli* DSM 22598, o una subsecuencia de la SEC ID nº 1 que codifica un fragmento de la SEC ID nº 2 que tiene actividad de celobiohidrolasa, como por ejemplo el polinucleótido de los nucleótidos 52 a 1595 de la SEC ID nº 1. En otro aspecto, el polinucleótido comprende o consiste en la SEC ID nº 3, la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 3, o la secuencia presente en el plásmido pGEM-T-CBHII45178 que está presente en *E. coli* DSM 22599, o una subsecuencia de la SEC ID nº 3 que codifica un fragmento de la SEC ID nº 4 que tiene actividad de celobiohidrolasa, como por ejemplo el polinucleótido de los nucleótidos 52 a 1581 de la SEC ID nº 3.

Constructos de ácido nucleico

[0102] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido de la presente invención enlazado operativamente a una o más secuencias de control (diferentes) que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0103] Se puede manipular un polinucleótido de varias formas para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en el vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Se conocen muy bien en la técnica técnicas para la modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante.

[0104] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que presente actividad transcripcional en la célula huésped preferida incluyendo promotores mutantes, truncados, e híbridos y se pueden obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o bien heterólogos a la célula huésped.

[0105] Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), gen *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, operón *lac* de *E. coli*, gen de agarosa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y gen beta-lactamasa procariótico (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Se describen otros promotores en "Useful proteins from recombinant bacteria" en el Gilbert et al., 1980, Scientific American, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, *supra*.

[0106] Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos a partir de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y también el promotor NA2-tpi (un promotor modificado a partir de un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en los *Aspergilli* donde se sustituyó el líder no traducido por un líder no traducido de un gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; algunos ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados del gen que codifica alfa-

amilasa neutra en el *Aspergillus niger* donde se sustituyó el líder no traducido por un líder no traducido del gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos del mismo.

[0107] En una levadura huésped, se obtienen promotores útiles a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y de 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0108] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de la transcripción adecuada, que la célula huésped reconoce para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está enlazada operativamente al extremo 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. En la presente invención se puede utilizar cualquier terminador que funcione en la célula huésped preferida.

[0109] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0110] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0111] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, cuando lo transcrito es una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de la célula huésped. La secuencia líder está enlazada operativamente al extremo 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Se puede usar cualquier secuencia líder que funcione en la célula huésped preferida.

[0112] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0113] Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0114] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia enlazada operativamente al extremo 3' del polinucleótido y, cuando ya ha sido transcrita, las células huésped la reconocen como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede utilizar cualquier secuencia de poliadenilación que funcione en la célula huésped preferida.

[0115] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0116] Son descritas secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura por Guo y Sherman, 1995, Mol. Celular Biol. 15: 5983-5990.

[0117] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-Terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido adentro de la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal enlazada naturalmente en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal foránea puede ser necesaria en el lugar donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante de péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, se puede utilizar cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirige el polipéptido expresado para la vía secretora de una célula huésped preferida.

[0118] Las secuencias codificantes del péptido señal que son eficaces en células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal que se obtienen de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*) y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0119] Las secuencias codificantes del péptido señal que son eficaces en las células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias de codificantes del péptido señal que se obtienen a partir de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0120] Los péptidos señal útiles para las células huésped de levaduras se obtienen a partir de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0121] La secuencia de control también puede ser una secuencia que codifica el propéptido que codifica un propéptido situado en el N-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se denomina proenzima o pro-polipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un pro-polipéptido está generalmente inactivo y es posible convertirlo en un polipéptido activo a través de la escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del pro-polipéptido. Se puede obtener la secuencia codificante del propéptido a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0122] Cuando ambas secuencias de péptido señal y de propéptido están presentes en el N-terminal de un polipéptido, la secuencia del propéptido está situada junto al N-terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situada junto al N-terminal de la secuencia del propéptido.

[0123] También puede ser deseable que se añadan secuencias reguladoras que permiten que se regule la expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión del gen se inicie o se detenga en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en los sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores *lac*, *tac* y *trp*. En la levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dehidrofolato reductasa que se amplifica en la presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría enlazado operativamente con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0124] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Se pueden juntar las varias secuencias nucleotídicas y secuencias de control para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción (diferentes) convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en esos sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector adecuado para la expresión. Cuando se crea el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector para que la secuencia codificante esté enlazada operativamente con las secuencias de control adecuadas para la expresión.

[0125] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que se puede someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la cual se insertará. El vector puede ser un plásmido circular lineal o cerrado.

[0126] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualesquier medios que aseguren la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando es insertado en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica en conjunto con el/los cromosoma(s) en los cuales se integró. Además, se

puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que contienen el ADN total que se insertará en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0127] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables (diferentes) que permiten seleccionar fácilmente las células transformadas, transfectadas, transducidas, o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

[0128] Algunos ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de la *Bacillus subtilis* o de la *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica como por ejemplo resistencia a la ampicilina, al cloranfenicol, la canamicina, o a la tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables que se pueden usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-d Descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Se prefiere que se usen los genes *amdS* e *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o de *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* en una célula de *Aspergillus*.

[0129] El vector contiene preferiblemente elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en una célula independiente del genoma.

[0130] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en lugar(es) preciso(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en un lugar preciso, los elementos integradores deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, como por ejemplo entre 100 y 10,000 pares de bases, entre 400 y 10,000 pares de bases, y entre 800 y 10,000 pares de bases, que tienen un grado de identidad de secuencia elevado respecto a la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integradores pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integradores pueden ser polinucleótidos no codificantes o polinucleótidos codificantes. En cambio, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no-homóloga.

[0131] Para llevar a cabo la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector se replique autónomamente en dicha célula huésped. El origen de replicación puede ser cualquier replicante del plásmido que media la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicante de plásmido" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o un vector se repliquen *in vivo*.

[0132] Algunos ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0133] Algunos ejemplos de orígenes de replicación que se pueden usar en una célula huésped de levadura son los orígenes de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0134] Algunos ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). Se puede lograr el aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen de acuerdo con los métodos descritos en WO 00/24883.

[0135] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido mediante la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o mediante la inclusión de un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde se pueden seleccionar las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y consecuentemente copias adicionales del polinucleótido, mediante el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable adecuado.

[0136] Un experto en la materia conocerá los procedimientos usados para enlazar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Células huésped

[0137] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención enlazado operativamente a una o más secuencias de control (diferentes) que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Un constructo o un vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped para que el constructo o el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y de su fuente.

[0138] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0139] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram positiva o gram negativa. Las bacterias gram positivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gram negativas incluyen, pero no se limitan a, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

[0140] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluye, pero no se limita a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

[0141] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* que incluye, pero no se limita a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y de *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0142] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* que incluye, pero no se limita a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0143] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede, por ejemplo, llevar a cabo mediante la transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), mediante el uso de células competentes (ver, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), mediante electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o mediante conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede, por ejemplo, llevar a cabo mediante la transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (ver, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede, por ejemplo, llevar a cabo mediante la transformación de protoplasto y electroporación (ver, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), mediante conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o mediante transducción (ver, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede, por ejemplo, llevar a cabo mediante electroporación (ver, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o mediante conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede, por ejemplo, llevar a cabo mediante competencia natural (ver, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), mediante transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), mediante electroporación (ver, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o mediante conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). No obstante, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula huésped.

[0144] La célula huésped también puede ser una eucariota, como por ejemplo una célula de un mamífero, un insecto, una planta, o de un fungo.

[0145] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Fúngico" como se utiliza en el presente documento incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como definen Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) así como el Oomycota (como viene citado en Hawksworth et al., 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos

(Hawksworth et al., 1995, *supra*).

[0146] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en el presente documento incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporógena, y levadura perteneciente a los Hongos Imperfectos (Blastomycetes). Como la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, se debe definir la levadura como se la describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0147] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia* como por ejemplo una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

[0148] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como viene definido por Hawksworth et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo ocurre a través del alargamiento de las hifas y el catabolismo del carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* ocurre a través de la brotación de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0149] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0150] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0151] Se pueden transformar las células fúngicas mediante un proceso que implica la formación de protoplasto, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular de un modo conocido de por sí. Los procedimientos adecuados para la transformación de las células huésped de *Aspergillus* y de *Trichoderma* se describen en EP 238023 y en Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* son descritos por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. Se pueden transformar levadura utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; e Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0152] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivar una célula, que en su forma de tipo natural produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Thielavia*. En un aspecto más preferido, la célula es *Thielavia hyrcaniae*. En un aspecto aún más preferido, la célula es *Thielavia hyrcaniae* NN045097. En otro aspecto aún más preferido, la célula es *Thielavia hyrcaniae* NN045178 (CGMCC 0864).

[0153] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones propicias para

la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[0154] Se cultivan las células huésped en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede cultivar la célula a través del cultivo en matraz oscilante, y de fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, discontinua, discontinua alimentada, o en estado sólido) en laboratorio o en fermentadores industriales llevada a cabo en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que se exprese y/o se aisle el polipéptido. El cultivo se lleva a cabo en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y de nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Hay disponibles medios adecuados por parte de proveedores comerciales o se pueden preparar según las composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si se segrega el polipéptido para el medio nutritivo, se puede recuperar el polipéptido directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, es posible recuperarlo de los lisatos de la célula.

[0155] Se puede detectar el polipéptido usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

[0156] Se puede recuperar el polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo a través de procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0157] El polipéptido se puede purificar a través de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos esencialmente puros.

[0158] En un aspecto alternativo, no se recupera el polipéptido, sino que se usa una célula huésped de la presente invención que expresa el polipéptido como una fuente del polipéptido.

Plantas

[0159] La presente invención también se refiere a plantas aisladas, por ejemplo, una planta, parte de planta, o célula vegetal transgénica, que comprenda un polinucleótido de la presente invención aislado para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o de la parte de la planta. Alternativamente, se puede utilizar la planta o parte de la planta que contiene el polipéptido para mejorar la calidad de un alimento o alimentación, por ejemplo, para mejorar el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

[0160] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledónea) o monocotiledónea (una monocotiledónea). Algunos ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tal como poa de prado (poa de los prados pratense, *Poa*), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, hierba templada, como por ejemplo *Agrostis*, y cereales, p. ej., trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0161] Algunos ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, plantas leguminosas, como por ejemplo altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), como por ejemplo la coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0162] Algunos ejemplos de partes de la planta son el tallo, el callo, las hojas, la raíz, las frutas, las semillas, y los tubérculos así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, p. ej., epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. También se consideran parte de la planta los compartimentos específicos de la célula vegetal, como por ejemplo cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma. Además, cualquier célula vegetal, independientemente del origen del tejido, se considera parte de la planta. Asimismo, también se consideran partes de la planta por ejemplo los tejidos específicos y las células aisladas para facilitar la utilización de la invención, por ejemplo, embriones, endospermas, aleuronas y los revestimientos de las semillas.

[0163] También se incluyen en el campo de la presente invención los descendientes de esas plantas, partes de la planta y células vegetales.

[0164] Se puede construir la planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido según los métodos conocidos en la técnica. Resumidamente, se construye la planta o la célula vegetal a través de la incorporación de uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido en el genoma huésped o en el genoma de cloroplasto de la planta y de la propagación de la planta o célula vegetal modificada resultante a una planta o célula vegetal transgénica.

[0165] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido enlazado operativamente con las secuencias reguladoras adecuadas necesarias para la expresión del polinucleótido en la planta o en la parte de la planta preferida. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar las células huésped en las cuales se integraron los constructos de expresión y las secuencias de ADN necesarias para insertar el constructo en dicha planta (este último depende del método de introducción de ADN que se usará).

[0166] Se determina la elección de secuencias reguladoras, como por ejemplo secuencias promotoras y secuencias terminadoras y opcionalmente secuencias señal o secuencias de tráfico, por ejemplo, en base a cuándo, dónde y cómo se desea que se exprese el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica del desarrollo, de la fase o del tejido, y el producto génico puede ir dirigido a un tejido o parte de la planta específicos como por ejemplo semillas u hojas. Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, Plant Physiology 86: 506.

[0167] Para la expresión constitutiva se puede utilizar el promotor 35S-CaMV, el promotor ubiquitina-1 de maíz, y el promotor de actina de arroz 1 (Franck et al., 1980, Cell 21: 285-294; Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689; Zhang et al., 1991, Plant Cell 3: 1155-1165). Los promotores específicos de órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor procedente de tejidos de sumidero de almacenamiento como por ejemplo semillas, tubérculos de patata y frutas (Edwards y Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303), o procedente de tejidos de sumidero metabólico como por ejemplo meristemas (Ito et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semilla como por ejemplo el promotor de glutelina, de prolamina, de globulina, o de albúmina procedente del arroz (Wu et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* procedente de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida procedente de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, J. Plant. Physiol. 152: 708-711), un promotor de una proteína procedente del cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento *napA* procedente de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, como se describe, por ejemplo, en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja como por ejemplo el promotor *rbcs* procedente del arroz o del tomate (Kyoizuka et al., 1993, Plant Physiol. 102: 991-1000), el promotor de gen de metiltransferasa de adenina del virus de chlorella (Mitra y Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26: 85-93), el promotor del gen *aldP* procedente del arroz (Kagaya et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 248: 668-674), o un promotor inducible por herida como por ejemplo el promotor *pin2* procedente de la patata (Xu et al., 1993, Plant Mol. Biol. 22: 573-588). Asimismo, se puede inducir el promotor mediante tratamientos abióticos como por ejemplo temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad, o mediante sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, como por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de plantas como el etileno, el ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

[0168] También se puede utilizar un elemento intensificador del promotor para lograr una expresión más elevada de un polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y el polinucleótido que codifica un polipéptido. Por ejemplo, Xu et al., 1993, *supra*, revelan el uso del primer intrón del gen actina 1 del arroz para mejorar la expresión.

[0169] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se puede elegir a partir de las que están disponibles en la técnica.

[0170] Se incorpora el constructo de ácido nucleico en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo la transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística, y electroporación (Gasser et al., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274).

[0171] Actualmente, la transferencia de gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método preferido para generar dicotiledóneas transgénicas (para un análisis, ver Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y también se puede usar para transformar monocotiledóneas, aunque frecuentemente se usan otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método preferido para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas de oro o de tungsteno microscópicas revestidas con el ADN transformante) de los callos embrionarios o de los embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la

transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como describen Omirulleh et al., 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428. Los métodos de transformación adicionales para el uso según la presente divulgación incluyen los métodos descritos en la patentes estadounidenses n 6,395,966 y 7,151,204.

[0172] Tras la transformación, los transformantes que incorporan el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas enteras según métodos muy conocidos en la técnica. Frecuentemente se concibe el procedimiento de transformación de manera que se eliminan selectivamente los genes de selección o bien durante la regeneración o bien en las generaciones siguientes usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T o escisión específica de sitio del gen de selección usando una recombinasa específica.

[0173] Además de la transformación directa de un genotipo específico de una planta con un constructo preparado según la presente invención, se pueden crear plantas transgénicas cruzando una planta que posee el constructo con una segunda planta que no posee el constructo. Por ejemplo, se puede insertar un constructo que codifica un polipéptido en una variedad específica de planta mediante el cruce, sin que sea necesario transformar directamente la planta de esa variedad. Por lo tanto, la presente invención abarca no sólo una planta regenerada directamente a partir de células que se transformaron según la presente invención, sino también la progenie de esas plantas. Como se utiliza en el presente documento, progenie puede referirse a la progenie de cualquier generación de una planta original preparada de acuerdo con la presente invención. Dicha progenie puede incluir un constructo de ADN preparado de acuerdo con la presente invención, o una parte de un constructo de ADN preparado de acuerdo con la presente invención. El cruce causa la introducción de un transgen en una línea de una planta a través de la polinización cruzada de una línea original con una línea de una planta donadora. Se divulgan más detalladamente algunos ejemplos no limitativos de esos pasos en la patente estadounidense nº 7,151,204.

[0174] Se pueden generar plantas a través de un proceso de retrocruce. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas denominadas genotipo, línea, consanguínea, o híbrida convertidos por retrocruce.

[0175] Se pueden utilizar marcadores genéticos para ayudar en la introgresión de uno o varios transgenes de la invención de un antecedente genético a otro. La selección asistida por marcadores tiene algunas ventajas con respecto a la reproducción convencional ya que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruce en particular. Por ejemplo, cuando una planta que posee una característica deseable pero tiene un antecedente genético no deseable agrónomicamente se cruza con una original de élite, se pueden utilizar marcadores genéticos para seleccionar progenie que no solo posee la característica de interés, sino que también tiene una proporción relativamente elevada del germoplasma deseado. De esta manera, se disminuye el número de generaciones necesarias para introgresar una o varias características en un antecedente genético específico.

[0176] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprenden: (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

Eliminación o reducción de la actividad de celobiohidrolasa

[0177] Se puede construir una célula mutante mediante la reducción o eliminación de la expresión del polinucleótido usando métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, inserciones, interrupciones, reemplazos, o delecciones. En un aspecto preferido, se inactiva el polinucleótido. El polinucleótido que se debe modificar o inactivar puede ser, por ejemplo, la región codificante o una parte de la misma esencial para la actividad, o un elemento regulador necesario para la expresión de la región codificante. Un ejemplo de tal secuencia reguladora o de control puede ser una secuencia promotora o una parte funcional de la misma, es decir, una parte que es suficiente para afectar la expresión del polinucleótido. Otras secuencias de control para la posible modificación incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, una secuencia de péptido señal, un terminador de transcripción, y un activador transcripcional.

[0178] Se puede llevar a cabo la modificación o inactivación del polinucleótido sometiendo la célula madre a mutagénesis y seleccionando las células mutantes en las cuales se redujo o se eliminó la expresión del polinucleótido. La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, un agente mutagénico físico o químico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis por PCR. Además, la mutagénesis se puede llevar a cabo usando cualquier combinación de estos agentes mutagénicos.

[0179] Algunos ejemplos de un agente mutagénico físico o químico adecuados para este fin incluyen la irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito sódico, ácido fórmico, y análogos de nucleótido.

[0180] Cuando se usan esos agentes, la mutagénesis se lleva a cabo normalmente a través de la incubación de la célula madre que será mutagenizada en presencia del agente mutagenizante preferido bajo condiciones adecuadas, y de la detección y/o selección de células mutantes cuya expresión del gen es reducida o inexistente.

[0181] Se puede llevar a cabo la modificación o inactivación del polinucleótido introduciendo, sustituyendo, o eliminando uno o más (varios) nucleótidos presentes en el gen o un elemento regulador necesario para la transcripción o traducción del mismo. Por ejemplo, se pueden insertar o eliminar nucleótidos para causar la introducción de un codón de terminación, la eliminación del codón de inicio, o un cambio en marco de lectura abierto. Tal modificación o inactivación se puede llevar a cabo mediante mutagénesis dirigida al sitio o mediante mutagénesis por PCR según los métodos conocidos en la técnica. Aunque, en principio, la modificación se puede llevar a cabo *in vivo*, es decir, directamente en la célula que expresa el polinucleótido que se debe modificar, se prefiere que la modificación se lleve a cabo *in vitro* como se ejemplifica a continuación.

[0182] Un ejemplo de una forma conveniente de eliminar o reducir la expresión de un polinucleótido se basa en técnicas de sustitución génica, delección génica, o interrupción génica. Por ejemplo, en el método de interrupción génica, se mutageniza *in vitro* una secuencia de ácido nucleico que corresponde al polinucleótido endógeno para producir una secuencia de ácido nucleico defectuosa que se transforma entonces en la célula madre para producir un gen defectuoso. La secuencia de ácido nucleico defectuosa reemplaza el polinucleótido endógeno mediante recombinación homóloga. Puede ser deseable que el polinucleótido defectuoso también codifique un marcador que se puede utilizar para seleccionar transformantes en los cuales el polinucleótido se ha destruido o modificado. En un aspecto particularmente preferido, el polinucleótido se interrumpe con un marcador seleccionable como los que se han descrito en el presente documento.

[0183] Los métodos para la producción y utilización de moléculas dsRNA para degradar selectivamente ARN se conocen bien en la técnica; ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n° 6,489,127, 6,506,559, 6,511,824 y 6,515,109.

[0184] Los métodos usados para cultivar y purificar el producto de interés se pueden llevar a cabo usando métodos conocidos en la técnica.

Composiciones

[0185] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se enriquecen en tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que se aumenta la actividad de celobiohidrolasa de la composición, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0186] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático fundamental, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, como por ejemplo una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrin glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasa. Se puede(n) producir la(s) enzima(s) adicional(es) usando, por ejemplo, un microorganismo perteneciente al género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0187] Se pueden preparar las composiciones de polipéptidos de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica y la composición puede estar en forma de líquido o de composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptidos puede estar en forma de granulado o de microgranulado. El polipéptido que se incluirá en la composición se puede estabilizar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

[0188] A continuación, se presentan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptidos de la invención. La dosis de la composición de polipéptidos de la invención y otras condiciones bajo las cuales se usa la composición se pueden determinar en base a los métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0189] La presente invención también se refiere a los siguientes métodos para el uso de los polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa o composiciones de los mismos.

[0190] La presente invención también se refiere a métodos para la degradación o conversión un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención. En un aspecto preferido, el método comprende además la recuperación del material celulósico degradado o convertido.

[0191] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un producto de fermentación, que comprenden: (a) sacarificar un material celulósico con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención; (b) fermentar el material celulósico sacarificado con uno o varios microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y (c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.

[0192] La presente invención también se refiere a métodos de fermentación de un material celulósico, que comprenden: fermentar el material celulósico con uno o varios microorganismos fermentadores, en la cual se sacrifica el material celulósico con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención. En un aspecto preferido, la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación. En otro aspecto preferido, el método comprende además la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

[0193] Se pueden utilizar los métodos de la presente invención para sacarificar un material celulósico en azúcares fermentables y para convertir los azúcares fermentables en muchas sustancias útiles, por ejemplo, combustible, etanol potable, y/o productos de fermentación (por ejemplo, ácidos, alcoholes, cetonas, gases, y similares). La producción de un producto de fermentación deseado a partir de material celulósico implica normalmente pretratamiento, hidrólisis enzimática (sacarificación) y fermentación.

[0194] El procesamiento del material celulósico según la presente invención se puede lograr usando procesos convencionales de la técnica. Además, los métodos de la presente invención se pueden implementar utilizando cualquier aparato de tratamiento de biomasa convencional configurado para funcionar de acuerdo con la invención.

[0195] La hidrólisis (sacarificación) y la fermentación, separadas o simultáneas, incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis y fermentación separadas (SHF por sus siglas en inglés); sacarificación y fermentación simultáneas (SSF por sus siglas en inglés); sacarificación y cofermentación simultáneas (SSCF por sus siglas en inglés); hidrólisis y fermentación híbridas (HHF por sus siglas en inglés); hidrólisis y cofermentación separadas (SHCF por sus siglas en inglés); hidrólisis y cofermentación híbridas (HHCF por sus siglas en inglés); y conversión microbiana directa (DMC por sus siglas en inglés). La SHF usa diferentes fases del proceso para en primer lugar hidrolizar enzimáticamente el material celulósico en azúcares fermentables, por ejemplo, azúcares de glucosa, celobiosa, celotriosa y pentosa, y entonces fermentar los azúcares fermentables en etanol. En la SSF, la hidrólisis enzimática del material celulósico y la fermentación de los azúcares en etanol se combinan en una única fase (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). La SSCF implica la cofermentación de varios azúcares (Sheehan, J., y Himmel, M., 1999, Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol, Biotechnol. Prog. 15: 817-827). La HHF implica una fase de hidrólisis separada, y además una fase de sacarificación y de hidrólisis simultánea, que se puede efectuar en el mismo reactor. Las fases de un proceso de HHF se pueden llevar a cabo a diferentes temperaturas, es decir, sacarificación enzimática a alta temperatura seguida de SSF a una temperatura inferior a lo que la cepa de fermentación tolera. La DMC combina los tres procesos (producción enzimática, hidrólisis, y fermentación) en una o más (varias) fases en las cuales se usa el mismo organismo para producir las enzimas que convertirán el material celulósico en azúcares fermentables y para convertir los azúcares fermentables en un producto final (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., y Pretorius, I. S., 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, Microbiol. Mol. Biol. Reviews 66: 506-577). Se entiende en el presente documento que se puede usar cualquier método conocido en la técnica que comprenda el pretratamiento, la hidrólisis enzimática (sacarificación), la fermentación, o una combinación de los mismos, para poner en práctica los métodos de la presente invención.

[0196] Un equipo convencional puede incluir un reactor de tanque agitado de alimentación discontinua, un reactor de tanque agitado discontinuo, un reactor de tanque agitado de flujo continuo con ultrafiltración, y/o un reactor de columna de flujo pistón continuo (Fernanda de Castilhos Corazza, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin e Ivo Neitzel, 2003,

Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis, *Acta Scientiarum. Technology* 25: 33-38; Gusakov, A. V., y Sinitsyn, A. P., 1985, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, *Enz. Microb. Technol.* 7: 346-352), un reactor de erosión (Ryu, S. K., y Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65), o un reactor con agitación intensiva inducida por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 141-153). Algunos tipos de reactor adicionales incluyen: reactores de tipo lecho fluidizado, flujo ascendente, inmovilizado, y de extrusión para hidrólisis y/o fermentación.

[0197] Pretratamiento. Cuando se ponen en práctica los métodos de la presente invención, se puede utilizar cualquier proceso de pretratamiento conocido en la técnica para disgregar los componentes de la pared celular vegetal de material celulósico (Chandra et al., 2007, Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 108: 67-93; Galbe y Zacchi, 2007, Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Adv. Biochem. Engin. / Biotechnol.* 108: 41-65; Hendriks y Zeeman, 2009, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technol.* 100: 10-18; Mosier et al., 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technol.* 96: 673-686; Taherzadeh y Karimi, 2008, Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, *Int. J. of Mol. Sci.* 9: 1621-1651; Yang y Wyman, 2008, Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol, *Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofr.* 2: 26-40).

[0198] También se puede someter el material celulósico a reducción de tamaño de partícula, pre-remojo, humectación, lavado, o tratamiento antes de que se usen los métodos de pretratamiento conocidos en la técnica.

[0199] Los pretratamientos convencionales incluyen, pero no se limitan a, pretratamiento con vapor (con o sin explosión), pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con agua caliente, pretratamiento alcalino, pretratamiento con cal, oxidación húmeda, explosión húmeda, explosión de fibra de amoníaco, pretratamiento organosolv, y pretratamiento biológico. Algunos pretratamientos adicionales incluyen pretratamientos por percolación de amoníaco, ultrasonidos, electroporación, microondas, CO₂ supercrítico, H₂O supercrítico, ozono, y por irradiación gamma.

[0200] Se puede pretratar el material celulósico antes de la hidrólisis y/o de la fermentación. El pretratamiento se lleva a cabo preferiblemente antes de la hidrólisis. Alternativamente, el pretratamiento se puede llevar a cabo al mismo tiempo que la hidrólisis enzimática para liberar azúcares fermentables, como por ejemplo glucosa, xilosa, y/o celobiosa. En la mayoría de los casos la propia fase de pretratamiento causa la conversión de parte de la biomasa en azúcares fermentables (incluso en ausencia de enzimas).

[0201] Pretratamiento con vapor: en el pretratamiento con vapor, se calienta el material celulósico para disgregar los componentes de la pared celular vegetal, que incluyen lignina, hemicelulosa, y celulosa para hacer la celulosa y otras fracciones, por ejemplo la hemicelulosa, accesibles a las enzimas. Se coloca o se pasa el material celulósico a través de una cuba de reacción en la cual se inyecta vapor para aumentar la temperatura hasta la temperatura y presión necesarias y se retiene en la cuba de reacción durante el tiempo de reacción deseado. El pretratamiento con vapor se lleva a cabo preferiblemente a 140-230°C, más preferiblemente a 160-200°C, y aún más preferiblemente a 170-190°C, donde la gama de temperatura ideal depende de si se añade algún catalizador químico. El tiempo de residencia del pretratamiento con vapor es preferiblemente de 1 a 15 minutos, más preferiblemente de 3 a 12 minutos, y aún más preferiblemente de 4 a 10 minutos, donde el tiempo de residencia ideal depende de la gama de temperatura y de si se añade algún catalizador químico. El pretratamiento con vapor permite cargas de sólidos relativamente elevadas, de modo que el material celulósico normalmente solo está húmedo durante el pretratamiento. El pretratamiento con vapor se combina frecuentemente con una descarga explosiva del material tras el pretratamiento, que se conoce como explosión de vapor, o sea, volver rápidamente a la presión atmosférica y crear un flujo turbulento del material para aumentar el área de superficie accesible mediante fragmentación (Duff y Murray, 1996, *Bioresource Technology* 855: 1-33; Galbe y Zacchi, 2002, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 618-628; Solicitud de patente estadounidense nº 20020164730). Durante el pretratamiento con vapor, los grupos de acetilo de hemicelulosa se escinden y el ácido resultante autocataliza la hidrólisis parcial de la hemicelulosa en monosacáridos y oligosacáridos. Se elimina apenas una parte de la lignina.

[0202] Se añade frecuentemente un catalizador como por ejemplo H₂SO₄ o SO₂ (normalmente 0,3 a 3% p/p) antes del pretratamiento con vapor, lo que reduce el tiempo y temperatura, aumenta la recuperación, y mejora la hidrólisis enzimática (Ballesteros et al., 2006, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132: 496- 508; Varga et al., 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-116: 509-523; Sassner et al., 2006, *Enzyme Microb. Technol.* 39: 756-762).

[0203] Pretratamiento químico: el término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina. Algunos ejemplos de procesos de

pretratamiento químico adecuados incluyen, por ejemplo, pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con cal, oxidación húmeda, explosión de fibra de amoníaco (AFEX por sus siglas en inglés), percolación de amoníaco (APR por sus siglas en inglés), y pretratamientos organosolv.

[0204] En el pretratamiento con ácido diluido, el material celulósico se mezcla con ácido diluido, normalmente H_2SO_4 y agua para formar un lodo, que se calienta con vapor hasta la temperatura deseada, y después de un tiempo de residencia se hace que vuelva rápidamente a la presión atmosférica. El pretratamiento con ácido diluido se puede llevar a cabo con varios tipos de reactor, por ejemplo, reactores de flujo pistón, reactores de contracorriente, o reactores de lecho de encogimiento contracorriente continuo (Duff y Murray, 1996, *supra*; Schell et al., 2004, *Bioresource Technol.* 91: 179-188; Lee et al., 1999, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 93-115).

[0205] También se pueden usar varios métodos de pretratamiento bajo condiciones alcalinas. Estos pretratamientos alcalinos incluyen, pero no se limitan a, pretratamiento de cal, oxidación húmeda, percolación de amoníaco (APR), y explosión de fibra de amoníaco (AFEX).

[0206] El pretratamiento con cal se lleva a cabo usando carbonato cálcico, hidróxido sódico, o amoníaco a temperaturas bajas de 85-150°C y tiempos de residencia desde 1 hora a varios días (Wyman et al., 2005, *Bioresource Technol.* 96: 1959-1966; Mosier et al., 2005, *Bioresource Technol.* 96: 673-686). Los documentos WO 2006/110891, WO 2006/11899, WO 2006/11900 y WO 2006/110901 divulgan métodos de pretratamiento que usan el amoníaco.

[0207] La oxidación húmeda es un pretratamiento térmico que se lleva a cabo normalmente a 180-200°C durante 5-15 minutos con la adición de un agente oxidante como por ejemplo peróxido de hidrógeno o sobrepresión de oxígeno (Schmidt y Thomsen, 1998, *Bioresource Technol.* 64: 139-151; Palonen et al., 2004, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 1-17; Varga et al., 2004, *biotechnol. Bioeng.* 88: 567-574; Martín et al., 2006, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1669-1677). El pretratamiento se lleva a cabo preferiblemente con 1-40% de materia seca, más preferiblemente con 2-30% de materia seca, y aún más preferiblemente con 5-20% de sustancia seca y se aumenta frecuentemente el pH inicial añadiendo un álcali como por ejemplo carbonato de sodio.

[0208] En una variante del método de pretratamiento de oxidación en húmedo, conocida como explosión mojada (combinación de oxidación húmeda y explosión de vapor), se puede usar hasta un 30% de materia seca. En la explosión mojada, el agente oxidante se introduce durante el pretratamiento tras un determinado tiempo de residencia. Entonces se finaliza el pretratamiento haciendo que vuelva rápidamente a la presión atmosférica (WO 2006/032282).

[0209] La explosión de fibra de amoníaco (AFEX) implica el tratamiento del material con amoníaco líquido o gaseoso a temperaturas moderadas como por ejemplo 90-100°C y alta presión como por ejemplo 17-20 bares durante 5-10 minutos, donde el contenido de materia seca puede llegar hasta el 60% (Gollapalli et al., 2002, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 23-35; Chundawat et al., 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 96: 219-231; Alizadeh et al., 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 1133-1141; Teymouri et al., 2005, *Bioresource Technol.* 96: 2014-2018). El pretratamiento AFEX causa la despolimerización de la celulosa y la hidrólisis parcial de la hemicelulosa. Los complejos lignina-carbohidrato se escinden.

[0210] El pretratamiento organosolv delignifica el material celulósico mediante extracción usando etanol acuoso (40-60% de etanol) a 160-200°C durante 30-60 minutos (Pan et al., 2005, *Biotechnol. Bioeng.* 90: 473-481; Pan et al., 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 94: 851-861; Kurabi et al., 2005, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 219-230). Se añade normalmente ácido sulfúrico como catalizador. En el pretratamiento organosolv, se elimina la mayor parte de la hemicelulosa.

[0211] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados son descritos por Schell et al., 2003, *Appl. Biochem. and Biotechnol.* Vol. 105-108, pp. 69-85, y Mosier et al., 2005, *Bioresource Technology* 96: 673-686, y Solicitud estadounidense publicada 2002/0164730.

[0212] En un aspecto, el pretratamiento químico se lleva a cabo como un tratamiento ácido, y más preferiblemente como un tratamiento continuo con un ácido diluido y/o un ácido suave. El ácido es normalmente ácido sulfúrico, pero también se pueden usar otros ácidos, como por ejemplo ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno, o mezclas de los mismos. El tratamiento con ácido suave se lleva a cabo en un rango de pH preferiblemente de 1-5, más preferiblemente de 1-4, aún más preferiblemente de 1-3. En un aspecto, la concentración del ácido está preferiblemente en el rango de 0,01 a 20 % en peso de ácido, más preferiblemente de 0,05 a 10 % en peso de ácido, más preferiblemente de 0,1 a 5 % en peso de ácido, y aún más preferiblemente de 0,2 a 2,0 % en peso de ácido. El ácido se pone en contacto con el material celulósico y se mantiene a una temperatura preferiblemente en el rango de 160-220°C, más preferiblemente de 165-195°C, durante periodos de tiempo que van desde segundos hasta minutos, por ejemplo, desde 1 segundo hasta 60 minutos.

[0213] En otro aspecto, el pretratamiento se lleva a cabo como una fase de la explosión de fibra de amoníaco (una fase del pretratamiento AFEX).

[0214] En otro aspecto, el pretratamiento se lleva a cabo en una suspensión acuosa. En aspectos preferidos, el material celulósico está presente durante el pretratamiento en cantidades preferiblemente entre 10 y 80 % en peso, más preferiblemente entre 20 y 70 % en peso, y aún más preferiblemente entre 30 a 60 % en peso, como por ejemplo alrededor de 50 % en peso. El material celulósico pretratado puede ser no lavado o lavado utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, lavado con agua.

[0215] Pretratamiento mecánico: el término "pretratamiento mecánico" se refiere a varios tipos de trituración o de molienda (p. ej., molienda en seco, molienda húmeda, o molienda vibratoria con bolas).

[0216] Pretratamiento físico: el término "pretratamiento físico" se refiere a cualquier pretratamiento que promueve la separación y/o liberación de la celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material celulósico. Por ejemplo, el pretratamiento físico puede implicar irradiación (por ejemplo, irradiación con microondas), explosión de vapor, hidrotermólisis, y combinaciones de los mismos.

[0217] El pretratamiento físico puede implicar presión elevada y/o temperatura elevada (explosión de vapor). En un aspecto, presión elevada significa presión en la gama de preferiblemente aproximadamente 300 a aproximadamente 600 psi, más preferiblemente de aproximadamente 350 a aproximadamente 550 psi, y aún más preferiblemente de aproximadamente 400 a aproximadamente 500 psi, como por ejemplo al alrededor de 450 psi. En otro aspecto, temperaturas elevadas significan temperaturas en la gama de aproximadamente 100 a aproximadamente 300°C, preferiblemente de aproximadamente 140 a aproximadamente 235°C. En un aspecto preferido, el pretratamiento mecánico se lleva a cabo en un sistema de hidrolizador de pistola de vapor de proceso discontinuo, que usa presión elevada y temperatura elevada tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, un hidrolizador Sunds puesto a disposición por Sunds Defibrator AB, Suecia.

[0218] Pretratamiento físico y químico combinados: se puede pretratar el material celulósico tanto físicamente como químicamente. Por ejemplo, la fase de pretratamiento puede implicar tratamiento con ácido diluido o suave y tratamiento con temperatura elevada y/o presión elevada. Los pretratamientos físicos y químicos se pueden llevar a cabo consecutiva o simultáneamente, conforme se desee. También se puede incluir un pretratamiento mecánico.

[0219] Por consiguiente, en un aspecto preferido, el material celulósico se somete a un pretratamiento mecánico, químico, o físico, o cualquier combinación de los mismos, para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

[0220] Pretratamiento biológico: el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material celulósico. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la utilización de microorganismos que solubilizan la lignina (ver, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh y Singh, 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson y Hahn-Hagerdal, 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; y Vallander y Eriksson, 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

[0221] Sacarificación. En el paso de hidrólisis, también conocido como sacarificación, el material celulósico, por ejemplo pretratado, se hidroliza para descomponer la celulosa y alternativamente también la hemicelulosa en azúcares fermentables, como por ejemplo glucosa, celobiosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, manosa, galactosa, y/o oligosacáridos solubles. La hidrólisis se lleva a cabo enzimáticamente usando una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la presente invención. La composición puede además comprender una o más (varias) enzimas hemicelulolíticas o enzimas que degradan el xilano. Los componentes enzimáticos y proteicos de la composición se pueden añadir secuencialmente.

[0222] La hidrólisis enzimática se lleva a cabo preferiblemente en un medio acuoso adecuado bajo condiciones que un experto en la técnica puede determinar fácilmente. En un aspecto preferido, la hidrólisis se lleva a cabo bajo condiciones adecuadas para la actividad de la(s) enzima(s), es decir, ideal para la(s) enzima(s). La hidrólisis se puede llevar a cabo

como un proceso discontinuo alimentado o continuo donde el material celulósico pretratado (sustrato) se agrega gradualmente a, por ejemplo, una solución de hidrólisis que contiene enzimas.

[0223] La sacarificación se lleva a cabo generalmente en reactores de tanque agitado o en fermentadores bajo pH, temperatura, y condiciones de mezclado controladas. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la duración del proceso y las condiciones de temperatura y pH adecuadas. Por ejemplo, la sacarificación puede durar hasta 200 horas, pero se lleva a cabo normalmente durante preferiblemente aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 16 a aproximadamente 72 horas, y aún más preferiblemente durante aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas. La temperatura está preferiblemente en la gama de aproximadamente 25°C a aproximadamente 70°C, más preferiblemente de aproximadamente 30°C a aproximadamente 65°C, y aún más preferiblemente de aproximadamente 40°C a 60°C, en particular aproximadamente 50°C. El pH está preferiblemente en la gama de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, más preferiblemente de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7, y aún más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, en particular alrededor de pH 5. El contenido de materia seca está preferiblemente en la gama de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 % en peso, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 % en peso, y aún más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % en peso.

[0224] En los métodos de la presente invención, la composición enzimática puede comprender cualquier proteína útil en la degradación o conversión del material celulósico.

[0225] En un aspecto, la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas/proteínas celulolíticas. En otro aspecto, la composición enzimática comprende o comprende además una o más (varias) enzimas hemicelulolíticas. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas celulolíticas y una o más (varias) enzimas hemicelulolíticas. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo de enzimas celulolíticas y enzimas hemicelulolíticas.

[0226] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas/proteínas celulolíticas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa y un polipéptido con actividad de aumento celulolítico. En otro aspecto, la composición enzimática comprende o comprende además una o más (varias) proteínas seleccionadas del grupo consistente en una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa y una swollenina. La hemicelulasa es preferiblemente una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una esterasa de acetilmanano, una acetilxilano esterasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronoilo, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa y una xilosidasa.

[0227] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una beta-glucosidasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende un polipéptido con actividad de aumento celulolítico. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de acetilmanano. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una acetilxilano esterasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una arabinanasa (por ejemplo, alfa-L-arabinanasa). En otro aspecto, la composición enzimática comprende una arabinofuranosidasa (por ejemplo, alfa-L-arabinofuranosidasa). En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de ácido cumárico. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una feruloil esterasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una galactosidasa (por ejemplo, alfa-galactosidasa y/o beta-galactosidasa). En otro aspecto, la composición enzimática comprende una glucuronidasa (por ejemplo, alfa-D-glucuronidasa). En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de glucuronoilo. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una mananasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una manosidasa (por ejemplo, beta-manosidasa). En otro aspecto, la composición enzimática comprende una xilanasa. En un aspecto preferido, la xilanasa es una xilanasa de la familia 10. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una xilosidasa.

[0228] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una expansina. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una enzima ligninolítica. En un aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una lacasa. En otro aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una peroxidasa de manganeso. En otro aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una peroxidasa de lignina. En otro aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una enzima productora de H₂O₂. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una pectinasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una peroxidasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una proteasa. En otro aspecto, la composición enzimática comprende una swollenina.

[0229] En los métodos de la presente invención, la(s) enzima(s)/proteína(s) se pueden añadir antes de o durante la fermentación, por ejemplo, durante la sacarificación o durante o después de la propagación del/de los microorganismo(s) de fermentación.

[0230] Uno o más (varios) componentes de la composición enzimática pueden ser proteínas de tipo natural, proteínas recombinantes, o una combinación de proteínas de tipo natural y proteínas recombinantes. Por ejemplo, uno o más (varios) componentes pueden ser proteínas nativas de una célula, lo que se usa como una célula huésped para expresar recombinantemente uno o más (varios) otros componentes de la composición enzimática. Uno o más (varios) componentes de la composición enzimática se pueden producir como monocomponentes, que son luego combinados para formar la composición enzimática. La composición enzimática puede ser una combinación de preparados de proteína multicomponentes y monocomponentes.

[0231] Las enzimas usadas en los métodos de la presente invención pueden ser adecuadas de cualquier forma para su uso en los procesos descritos aquí, tal como, por ejemplo, un caldo de fermentación crudo con o sin células retiradas, un lisado celular con o sin detrito celular, un preparado enzimático semi-purificado o purificado, o una célula huésped como fuente de enzimas. La composición enzimática puede ser un polvo seco o granulado, un granulado no polvoriento, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida estabilizada. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico según procesos establecidos.

[0232] Las cantidades óptimas de las enzimas y polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa dependen de diferentes factores que incluyen, pero no se limitan a, la mezcla de enzimas celulolíticas componente, el sustrato celulósico, la concentración de sustrato celulósico, el pretratamiento(s) del sustrato celulósico, temperatura, tiempo, pH, e inclusión de organismo fermentador (por ejemplo, levadura para sacarificación y fermentación simultáneas).

[0233] En un aspecto preferido, una cantidad eficaz de proteína celulolítica para material celulósico es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 20 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 15 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg, y de la forma más preferible de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 10 mg por g de material celulósico.

[0234] En otro aspecto preferido, una cantidad eficaz de polipéptido(s) con actividad de celobiohidrolasa para material celulósico es aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 50,0 mg, preferiblemente aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 40 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 30 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 20 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 10 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 5 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,025 a aproximadamente 1,5 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,05 a aproximadamente 1,25 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,075 a aproximadamente 1,25 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 1,25 mg, incluso más preferiblemente aproximadamente de 0,15 a aproximadamente 1,25 mg, y de la forma más preferible aproximadamente de 0,25 a aproximadamente 1,0 mg por g de material celulósico.

[0235] En otro aspecto preferido, una cantidad eficaz de polipéptido(s) con actividad de celobiohidrolasa para proteína celulolítica es de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1,0 g, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,5 g, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 g, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,25 g, y de la forma más preferible de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 g por g de proteína celulolítica.

[0236] Las enzimas pueden ser derivadas u obtenidas de cualquier origen adecuado, incluyendo origen bacteriano, fúngico, levadura, planta o mamífero. El término "obtenido" significa aquí que la enzima puede haber sido aislada a partir de un organismo que produce naturalmente la enzima como una enzima nativa. El término "obtenido" significa también en el presente documento que la enzima puede haber sido producida recombinantemente en un organismo huésped empleando métodos descritos en el presente documento, donde la enzima producida recombinantemente es o bien nativa o bien foránea al organismo huésped o tiene una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, con uno o más (varios) aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida recombinantemente que es una mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácido nucleico conocidos en la técnica. Englobado dentro del significado de una enzima nativa hay variantes naturales y dentro del significado de una enzima foránea hay variantes obtenidas recombinantemente, tal como por mutagénesis de sitio dirigido o redistribución.

[0237] El polipéptido con actividad enzimática puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido de bacteria Gram positiva tal como un polipéptido de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus* u *Oceanobacillus* con actividad enzimática, o un polipéptido de bacteria Gram negativa tal como un polipéptido de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria* o *Ureaplasma* con actividad enzimática.

[0238] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis* con actividad enzimática.

[0239] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* o *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus* con actividad enzimática.

[0240] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* o *Streptomyces lividans* con actividad enzimática.

[0241] El polipéptido con actividad enzimática también puede ser un polipéptido fúngico, y más preferiblemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia* con actividad enzimática; o más preferiblemente un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotrichonympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* o *Xylaria* con actividad enzimática.

[0242] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis* con actividad enzimática.

[0243] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia speditonum*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride* o *Trichophaea saccata* con actividad enzimática.

[0244] Se pueden usar también mutantes de los polipéptidos con actividad enzimática químicamente modificados o creados genéticamente a partir de proteína.

[0245] Uno o más (varios) componentes de la composición enzimática pueden ser un componente recombinante, es decir, producido mediante clonación de una secuencia de ADN que codifica el único componente y la consiguiente célula transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (ver, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244). El huésped es preferiblemente un huésped heterólogo (la enzima es foránea para el huésped), pero el huésped puede bajo ciertas condiciones también ser un huésped homólogo (la enzima es nativa del huésped). Las proteínas celulolíticas monocomponentes también se pueden preparar mediante purificación de tal proteína a partir de un caldo de fermentación.

[0246] Ejemplos de preparaciones de proteína celulolítica comercial adecuadas para su uso en la presente invención

incluyen, por ejemplo, CELLIC™ Ctec (Novozymes A/S), CELLUCLAST™ (Novozymes A/S), NOVOZYME™ 188 (Novozymes A/S), CELLUZYME™ (Novozymes A/S), CEREFLO™ (Novozymes A/S), y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), ACCELERASE™ (Genencor Int.), LAMINEX™ (Genencor Int.), SPEZYME™ CP (Genencor Int.), ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH), FIBREZYME® LDI (Dyadic Internacional, Inc.), FIBREZYME® LBR (Dyadic Internacional, Inc.), o VISCOSTAR® 150L (Dyadic Internacional, Inc.). Las enzimas de celulasa se añaden en cantidades efectivas desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5.0 % en peso de sólidos, más preferiblemente desde aproximadamente 0.025 a aproximadamente 4.0 % en peso de sólidos, y de la forma más preferible desde aproximadamente 0.005 a aproximadamente 2.0 % en peso de sólidos. Las enzimas de celulasa se añaden en cantidades efectivas desde aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5.0 % en peso de sólidos, más preferiblemente desde aproximadamente 0.025 a aproximadamente 4.0 % en peso de sólidos, y de la forma más preferible desde aproximadamente 0.005 a aproximadamente 2.0 % en peso de sólidos.

[0247] Se pueden usar ejemplos de endoglucanasas bacterianas en los métodos de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a, una endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* (WO 91/05039; WO 93/15186; Patente estadounidense nº 5,275,944; WO 96/02551; Patente estadounidense nº 5,536,655, WO 00/70031, WO 05/093050); endoglucanasa III de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050); y endoglucanasa V de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050).

[0248] Se pueden usar ejemplos de endoglucanasas fúngicas en los métodos de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a, una endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (Penttilä et al., 1986, Gene 45: 253-263; nº de registro de GENBANK™ M15665); endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* (Saloheimo, et al., 1988, Gene 63:11-22; nº de registro de GENBANK™ M19373); endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* (Okada et al., 1988, Appl. Environ. Microbiol. 64: 555-563; nº de registro de GENBANK™ AB003694); y endoglucanasa V de *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 1994, Molecular Microbiology 13: 219-228; nº de registro de GENBANK™ Z33381); endoglucanasa de *Aspergillus aculeatus* (Ooi et al., 1990, Nucleic Acids Research 18: 5884); endoglucanasa de *Aspergillus kawachii* (Sakamoto et al., 1995, Current Genetics 27: 435-439); endoglucanasa de *Erwinia carotovora* (Saarilahti et al., 1990, Gene 90: 9-14); endoglucanasa de *Fusarium oxysporum* (nº de registro de GENBANK™ L29381); endoglucanasa de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (nº de registro de GENBANK™ AB003107); endoglucanasa de *Melanocarpus albomyces* (nº de registro de GENBANK™ MAL515703); endoglucanasa de *Neurospora crassa* (nº de registro de GENBANK™ XM_324477); endoglucanasa V de *Humicola insolens*; endoglucanasa de *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65; endoglucanasa de basidiomiceto CBS 495.95; endoglucanasa de basidiomiceto CBS 494.95; endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6B; endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL6C; endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7C; endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7E; endoglucanasa de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 CEL7F; endoglucanasa de *Cladorrhinum foecundissimum* ATCC 62373 CEL7A; y endoglucanasa de cepa nº VTT-D- 80133 de *Trichoderma reesei* (nº de registro de GENBANK™ M15665).

[0249] Ejemplos de celobiohidrolasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*; celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*; celobiohidrolasa I de *Humicola insolens*, celobiohidrolasa II de *Myceliophthora thermophila*, celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* (CEL6A), celobiohidrolasa I de *Chaetomium thermophilum* y celobiohidrolasa II de *Chaetomium thermophilum*.

[0250] Ejemplos de beta-glucosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*; beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*; beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* I BT 20888; beta-glucosidasa de *Aspergillus niger*; y beta-glucosidasa de *Aspergillus aculeatus*.

[0251] El polipéptido de *Aspergillus oryzae* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según el documento WO 2002/095014. El polipéptido de *Aspergillus fumigatus* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según el documento WO 2005/047499. El polipéptido de *Penicillium brasilianum* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según el documento WO 2007/019442. El polipéptido de *Aspergillus niger* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según Dan et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 4973-4980. El polipéptido de *Aspergillus aculeatus* con actividad de beta-glucosidasa puede ser obtenido según Kawaguchi et al., 1996, gen 173: 287-288.

[0252] La beta-glucosidasa puede ser una proteína de fusión. En un aspecto, la beta-glucosidasa es la proteína de fusión de la variante BG de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* o la proteína de fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* obtenida según el documento WO 2008/057637.

[0253] Otras endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas se describen en numerosas familias de glicosil hidrolasa que utilizan la clasificación según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat B., y Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0254] Otras enzimas celulolíticas que se pueden usar en la presente invención son descritas en los documentos EP

495,257, EP 531,315, EP 531,372, WO 89/09259, WO 94/07998, WO 95/24471, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 96/034108, WO 97/14804, WO 98/08940, WO 98/012307, WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 98/028411, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025846, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2000/009707, WO 2002/050245, WO 2002/0076792, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, Patente estadounidense nº 4,435,307, Patente estadounidense nº 5,457,046, Patente estadounidense nº 5,648,263, Patente estadounidense nº 5,686,593, Patente estadounidense nº 5,691,178, Patente estadounidense nº 5,763,254, y Patente estadounidense nº 5,776,757.

[0255] En los métodos de la presente invención, se puede usar cualquier polipéptido de GH61 con actividad de aumento celulolítico.

[0256] En un primer aspecto, el polipéptido con actividad de aumento celulolítico comprende los siguientes diseños:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV],

donde X es cualquier aminoácido, X(4,5) es cualquier aminoácido en 4 o 5 posiciones contiguas, y X(4) es cualquier aminoácido en 4 posiciones contiguas.

[0257] El polipéptido que comprende los diseños nombrados anteriormente puede comprender además:

H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV],
[EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV], o
H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] y [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV],

donde X es cualquier aminoácido, X(1,2) es cualquier aminoácido en 1 posición o 2 posiciones contiguas, X(3) es cualquier aminoácido en 3 posiciones contiguas, y X(2) es cualquier aminoácido en 2 posiciones contiguas. En los diseños anteriores, se emplea la abreviatura de aminoácido de letra única aceptada por la IUPAC.

[0258] En un aspecto preferido, el polipéptido con actividad de aumento celulolítico comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV]. En otro aspecto preferido, el polipéptido aislado con actividad de aumento celulolítico comprende además [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV]. En otro aspecto preferido, el polipéptido con actividad de aumento celulolítico comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] y [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].

[0259] En un segundo aspecto, el polipéptido con actividad de aumento celulolítico comprende el siguiente diseño:

[ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ],

donde x es cualquier aminoácido, x(4,5) es cualquier aminoácido en 4 o 5 posiciones contiguas, y x(3) es cualquier aminoácido en 3 posiciones contiguas. En el diseño anterior, se emplea la abreviatura de aminoácido de letra única aceptada por la IUPAC.

[0260] Los ejemplos de polipéptidos con actividad de aumento celulolítico útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos con actividad de aumento celulolítico a partir de *Thielavia terrestris* (WO 2005/074647); polipéptidos con actividad de aumento celulolítico a partir de *Thermoascus aurantiacus* (WO 2005/074656); polipéptidos con actividad de aumento celulolítico a partir de *Trichoderma reesei* (WO 2007/089290); y polipéptidos con actividad de aumento celulolítico a partir de *Myceliophthora thermophila* (WO 2009/085935; WO 2009/085859; WO 2009/085864; WO 2009/085868).

[0261] Ejemplos de preparados enzimáticos hemicelulolíticos comerciales (por ejemplo, degradantes de xilano) adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, SHEARZYME™ (Novozymes A/S), CELLIC™ Htec (Novozymes A/S), VISCOZYME® (Novozymes A/S), ULTRAFLO® (Novozymes A/S), PULPZYME® HC (Novozymes A/S), MULTIFECT® Xylanase (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 Xylanase (DSM), DEPOL™ 333P (Biocatalysts Limit, Gales, GB), DEPOL™ 740L (Biocatalysts Limit, Gales, GB) y DEPOL™ 762P (Biocatalysts Limit, Gales, GB).

[0262] Ejemplos de xilanasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP: AAR63790; WO 94/21785), xilanasas de *Aspergillus fumigatus* (WO 2006/078256), y xilanasas de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/079210).

[0263] Ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* (número de registro de UniProtKB/TrEMBL Q92458), *Talaromyces emersonii* (número de registro de SwissProt Q8X212), y *Neurospora crassa* (número de registro de SwissProt Q7SOW4).

[0264] Ejemplos de esterases de acetilxilano útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, acetilxilano esterasa de *Hypocrea jecorina* (WO 2005/001036), acetilxilano esterasa de *Neurospora crassa* (número de registro de UniProt q7s259), esterasa de acetilxilano de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/042846), acetilxilano esterasa de *Chaetomium globosum* (número de registro de UniProt Q2GWX4), acetilxilano esterasa de *Chaetomium gracile* (número de registro de GeneSeqP AAB82124), acetilxilano esterasa de *Phaeosphaeria nodorum* (número de registro de UniProt Q0UHH1) y acetilxilano esterasa de *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/073709).

[0265] Ejemplos de esterases de ácido ferúlico útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, feruloil esterasa de *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/076122), feruloil esterasa de *Neurospora crassa* (número de registro de UniProt Q9HGR3), y feruloil esterasa de *Neosartorya fischeri* (número de registro de UniProt A1D9T4).

[0266] Ejemplos de arabinofuranosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, arabinofuranosidasa de *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/073383) y arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger* (número de registro de GeneSeqP AAR94170).

[0267] Ejemplos de alfa-glucuronidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alfa-glucuronidasa de *Aspergillus clavatus* (número de registro de UniProt alcc12), alfa-glucuronidasa de *Trichoderma reesei* (número de registro de UniProt Q99024), alfa-glucuronidasa de *Talaromyces emersonii* (número de registro de UniProt Q8X211), alfa-glucuronidasa de *Aspergillus niger* (número de registro de UniProt Q96WX9), alfa-glucuronidasa de *Aspergillus terreus* (número de registro de SwissProt Q0CJP9) y alfa-glucuronidasa de *Aspergillus fumigatus* (número de registro de SwissProt Q4WW45).

[0268] Las enzimas y proteínas usadas en los métodos de la presente invención se pueden producir mediante fermentación de las cepas microbianas anteriormente mencionadas en un medio nutritivo que contiene fuentes de carbono y nitrógeno adecuadas y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bennett, J.W. y LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991). Hay disponibles medios adecuados a partir de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Se conocen en la técnica rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y producción enzimática (véase, por ejemplo, Bailey, J.E., y Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, Editorial McGraw-Hill, NY, 1986).

[0269] La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula que da como resultado la expresión o aislamiento de una enzima. La fermentación puede, por lo tanto, entenderse como que comprende un cultivo en matraz de agitación, o una fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, en lote, en lote alimentado, o en estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que la enzima se exprese o aísle. Las enzimas resultantes producidas mediante los métodos anteriormente descritos pueden ser recuperadas del medio de fermentación y purificadas mediante procedimientos convencionales.

[0270] Fermentación. Los azúcares fermentables obtenidos del material celulósico hidrolizado se pueden fermentar por uno o más (varios) microorganismos fermentadores capaces de fermentar los azúcares directamente o indirectamente en un producto de fermentación deseada. "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprende un paso de fermentación. Los procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco. Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y del organismo fermentador y pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica.

[0271] En el paso de fermentación, los azúcares, liberados a partir de material celulósico como resultado del pretratamiento y pasos de hidrólisis enzimática, son fermentados en un producto, por ejemplo, etanol, por un organismo fermentador, tal como levadura. La hidrólisis (sacarificación) y fermentación puede ser independientes o simultáneas, como se describe en el presente documento.

[0272] Se puede usar cualquier material celulósico hidrolizado adecuado en el paso de fermentación en la práctica de la presente invención. El material se selecciona generalmente en base al producto de fermentación deseado, es decir, la sustancia a ser obtenida de la fermentación, y el proceso empleado, como es bien conocido en la técnica.

[0273] El término "medio de fermentación" se entiende en el presente documento para referirse a un medio antes de que se añada(n) el(los) microorganismo(s) de fermentación, tal como, un medio que resulta de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en una sacarificación simultánea y proceso de fermentación (SSF).

[0274] "Microorganismo de fermentación" se refiere a cualquier microorganismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuado para su uso en un proceso de fermentación deseado para producir un producto de fermentación. El organismo fermentador puede ser organismos fermentadores C₆ y/o C₅, o una combinación de los mismos. Ambos organismos fermentadores C₆ y C₅ son bien conocidos en la técnica. Los microorganismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, maltosa, manosa, galactosa u oligosacáridos, directamente o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

[0275] Los ejemplos de organismos fermentadores bacterianos y fúngicos que producen etanol son descritos por Lin et al., 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

[0276] Los ejemplos de microorganismos fermentadores que pueden fermentar azúcares C₆ incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tal como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

[0277] Los ejemplos de organismos fermentadores que pueden fermentar azúcares C₅ incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tales como levadura. La levadura fermentadora C₅ preferida incluye cepas de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis*, tal como *Pichia stipitis* CBS 5773; cepas de *Candida*, preferiblemente *Candida boidinii*, *Candida brassicae*, *Candida sheatae*, *Candida diddensii*, *Candida pseudotropicalis* o *Candida utilis*.

[0278] Otros organismos fermentadores incluyen cepas de *Zymomonas*, tal como *Zymomonas mobilis*; *Hansenula*, tal como *Hansenula anomala*; *Kluyveromyces*, tal como *K. fragilis*; *Schizosaccharomyces*, tal como *S. pombe*; y *E. coli*, especialmente cepas de *E. coli* que han sido modificadas genéticamente para mejorar el rendimiento del etanol.

[0279] En un aspecto preferido, la levadura es una *Saccharomyces* spp. En un aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces distaticus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces uvarum*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Kluyveromyces*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida boidinii*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida brassicae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida diddensii*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida pseudotropicalis*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida utilis*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Clavispora*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora lusitaniae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora opuntiae*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Pachysolen*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Pachysolen tannophilus*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Pichia*. En otro aspecto más preferido, la levadura es una *Pichia stipitis*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Bretanomyces*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Bretanomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

[0280] Las bacterias que pueden fermentar eficazmente hexosa y pentosa en etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, *supra*).

[0281] En un aspecto preferido, la bacteria es una *Zymomonas*. En un aspecto más preferido, la bacteria es *Zymomonas mobilis*. En otro aspecto preferido, la bacteria es una *Clostridium*. En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Clostridium thermocellum*.

[0282] La levadura disponible comercialmente adecuada para la producción de etanol incluye, por ejemplo, levadura ETHANOL RED™ (disponible por Fermentis/Lesaffre, EE.UU.), FALI™ (disponible por Fleischmann's Yeast, EE.UU.), levadura fresca SUPERSTART™ y THERMOSACC™ (disponible por Ethanol Technology, WI, EE.UU.), BIOFERM™ AFT y XR (disponible por NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU.), GERT STRAND™ (disponible por Gert Strand AB, Suecia), y FERMIOL™ (disponible por DSM Specialties).

[0283] En un aspecto preferido, el microorganismo fermentador ha sido modificado genéticamente para proporcionar la capacidad para fermentar azúcares de pentosa, tal como microorganismos que usan xilosa, que usan arabinosa, y que co-usan xilosa y arabinosa.

[0284] La clonación de genes heterólogos en varios microorganismos fermentadores ha llevado a la construcción de

organismos capaces de convertir hexosas y pentosas en etanol (cofermentación) (Chen y Ho, 1993, Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Biochem. Biotechnol. 39-40: 135-147; Ho et al., 1998, Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose, Appl. Environ. Microbiol. 64: 1852-1859; Kotter y Ciriacy, 1993, Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 776-783; Walfridsson et al., 1995, Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 y TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase, Appl. Environ. Microbiol. 61: 4184-4190; Kuyper et al., 2004, Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle, FEMS Yeast Research 4: 655-664; Beall et al., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*, Biotech. Bioeng. 38: 296-303; Ingram et al., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng. 58: 204-214; Zhang et al., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, Science 267: 240-243; Deanda et al., 1996, Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4465-4470; WO 2003/062430, xylose isomerase).

[0285] En un aspecto preferido, el microorganismo fermentador modificado genéticamente es *Saccharomyces cerevisiae*. En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador modificado genéticamente es *Zymomonas mobilis*. En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador modificado genéticamente es *Escherichia coli*. En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador modificado genéticamente es *Klebsiella oxytoca*. En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador modificado genéticamente es *Kluyveromyces* sp.

[0286] Es bien conocido en la técnica que los organismos anteriormente descritos también pueden usarse para producir otras sustancias, como se describe en el presente documento.

[0287] El microorganismo fermentador se añade normalmente a la lignocelulosa o hidrolizado degradados y la fermentación se realiza durante aproximadamente 8 a aproximadamente 96 horas, tal como aproximadamente 24 a aproximadamente 60 horas. La temperatura se encuentra normalmente entre aproximadamente 26°C y aproximadamente 60°C, en particular aproximadamente 32°C o 50°C, y en alrededor de pH 3 a aproximadamente pH 8, tal como alrededor de pH 4-5, 6 o 7.

[0288] En un aspecto preferido, la levadura y/o otro microorganismo se aplica al material celulósico degradado y la fermentación se realiza durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, tal como normalmente 24-60 horas. En un aspecto preferido, la temperatura se encuentra preferiblemente entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 60°C, más preferiblemente entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 50°C, y de la forma más preferible entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 50°C, en particular entre aproximadamente 32°C y 50°C, y el pH se encuentra generalmente desde aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 7, preferiblemente alrededor de pH 4-7. No obstante, algunos organismos fermentadores, por ejemplo, bacterias, tienen una temperatura de fermentación óptima más alta. La levadura u otro microorganismo se aplica preferiblemente en cantidades de aproximadamente 10^5 a 10^{12} , preferiblemente desde aproximadamente 10^7 a 10^{10} , especialmente aproximadamente 2×10^8 concentración de células viable por ml de caldo de fermentación. Se puede encontrar más información respecto al uso de levadura para la fermentación en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editores K. Jacques, T.P. Lyons y D.R. Kelsall, Nottingham University Press, Gran Bretaña 1999).

[0289] Para la producción de etanol, después de la fermentación se destila el lodo fermentado para extraer el etanol. El etanol obtenido según los métodos de la invención se puede usar como, por ejemplo, etanol de combustible, etanol potable, es decir, licores neutros potables, o etanol industrial.

[0290] Un estimulador de fermentación se puede usar en combinación con cualquiera de los procesos descritos en el presente documento para mejorar más el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como, mejora del índice y rendimiento del etanol. Un "estimulador de la fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentadores, en particular, levadura. Los estimuladores de fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Los ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzóico, ácido fólico, riboflavina, y vitaminas A, B, C, D y E. Ver, por ejemplo, Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002). Los ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn y Cu.

[0291] Productos de fermentación: un producto de fermentación puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. El producto de fermentación puede ser, sin limitarse a, un alcohol (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol, y xilitol); un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido

adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diketo-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico, y ácido xilónico); una cetona (por ejemplo, acetona); un aminoácido (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); y un gas (por ejemplo, metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂), y monóxido de carbono (CO)). El producto de fermentación también puede ser proteína como producto de alto valor.

[0292] En un aspecto preferido, el producto de la fermentación es un alcohol. Se entiende que el término "alcohol" engloba una sustancia que contiene una o varias fracciones de hidroxilo. En un aspecto más preferido, el alcohol es arabinol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es butanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es etanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es 1,3-propanodiol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es sorbitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es xilitol. Ver, por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., editorial Springer-Verlag Berlín Heidelberg, Alemania, 65: 207-241; Silveira, M. M., y Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., y Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. y Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.

[0293] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un ácido orgánico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acético. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acetónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido adípico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido ascórbico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido cítrico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido 2,5-diketo-D-glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fórmico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fumárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucurónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glutárico. En otro aspecto preferido, el ácido orgánico es ácido 3-hidroxipropiónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido itacónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido láctico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido málico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido malónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido oxálico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es propiónico ácido. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido succínico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido de xilónico. Ver, por ejemplo, Chen, R., y Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448.

[0294] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es una cetona. Se entiende que el término "cetona" engloba una sustancia que contiene una o varias fracciones de cetona. En otro aspecto más preferido, la cetona es acetona. Ver, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, *supra*.

[0295] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un aminoácido. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido aspártico. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es ácido glutámico. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es glicina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es lisina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es serina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es treonina. Ver, por ejemplo, Richard, A., y Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 501-515.

[0296] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un gas. En otro aspecto más preferido, el gas es metano. En otro aspecto más preferido, el gas es H₂. En otro aspecto más preferido, el gas es CO₂. En otro aspecto más preferido, el gas es CO. Ver, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya, y K. Kiriya, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Science and Technology* 36 (6-7): 41-47; y Gunaseelan V.N. in *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.

[0297] Recuperación. El(los) producto(s) de fermentación puede(n) ser opcionalmente recuperado(s) del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica que incluya, pero no se limite a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol es separado del material celulósico fermentado y purificado mediante métodos de destilación convencionales. Puede obtenerse etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 % vol., que se puede usar como, por ejemplo, etanol para combustible, etanol potable, es decir, licores neutros potables o etanol industrial.

[0298] La presente invención es posteriormente descrita por los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados como limitación del alcance de la invención.

Ejemplos

[0299] Los productos químicos usados como tampones y sustratos eran productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Medios

[0300] Las placas de agar YG estaban compuestas por 5,0 g de extracto de levadura en polvo Difco, 10,0 g de glucosa, 20,0 g de agar, y agua desionizada a 1 litro.

[0301] Las placas PDA estaban compuestas por 39 g de agar de dextrosa de patata y agua desionizada a 1 litro.

[0302] Las placas de medio mínimo estaban compuestas por 6 g de NaNO₃, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH₂PO₄, 1 ml de solución de oligoelementos COVE, 20 g de agar noble, 20 ml de 50% glucosa, 2,5 ml de MgSO₄·7H₂O, 20 ml de una solución de biotina al 0,02%, y agua desionizada a 1 litro.

[0303] La solución de oligoelementos COVE estaba compuesta por 0,04 g de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,4 g de CuSO₄·5H₂O, 1,2 g de FeSO₄·7H₂O, 0,7 g de MnSO₄·H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 10 g de ZnSO₄·7H₂O, y agua desionizada a 1 litro.

[0304] El medio YPM estaba compuesto por 2% extracto de levadura, 2% peptona, y 1% de maltosa.

Ejemplo 1: aislamiento de cepas de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y NN045097

[0305] Las cepas de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y NN045097 fueron aisladas a partir de muestras de tierra recogidas en Yunnan China el 9 de marzo de 1999. Las cepas fueron aisladas aplicando una solución en suspensión de tierra en placas de agar YG seguido de una incubación a 45°C durante 3-5 días y además una purificación de colonias fúngicas. Las cepas fueron identificadas tanto por caracteres morfológicos como por secuenciación del ADN de las regiones de espaciador interno transcrito (ITS por sus siglas en inglés). Se depositó *Thielavia hyrcaniae* NN045178 con el centro China General Microbiological Culture Collection Center y se le asignó el número de depósito CGMCC 0864.

Ejemplo 2: extracción del ADN genómico de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y NN045097

[0306] Ambas cepas de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y NN045097 fueron cultivadas independientemente en placas de agar PDA a 45°C durante 3 días. Se recogió cada micelio directamente de las placas de agar en morteros esterilizados y se congelaron en nitrógeno líquido. Los micelios congelados fueron molidos, con mortero y mano, hasta obtener un polvo fino, y se aisló ADN genómico utilizando un equipo DNEASY® Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU.).

Ejemplo 3: aislamiento de genes en toda su longitud de celobiohidrolasa de la familia 6 de las cepas *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y NN045097

[0307] Se identificó una secuencia parcial de un gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 mediante la prueba PCR utilizando las sondas mostradas a continuación, que fueron derivadas de las regiones conservadas de genes de celobiohidrolasa de la familia 6 conocidos.

Cebador CBHIIDF1:

t(gt)cc(tc)ga(tc)cg(tc)ga(tc)tg(tc)gc (SEC ID nº 5)

Cebador CBHIIDR2:

tc(ag)ccacc(gt)ggctt(gt)a(tc)cca (SEC ID nº 6)

[0308] Se aisló un gen en toda su longitud de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 utilizando un equipo Genome Walking Kit (Takara Bio Inc., Seta 3-4-1, Otsu, Shiga, 520-2193, Japón) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se usó el ADN genómico total de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 como modelo para amplificaciones PCR del extremo 5' y el extremo 3' del gen. Se usaron dos cebadores específicos de gen mostrados a continuación para cada clonación, uno para PCR primaria y uno para PCR secundaria. Los cebadores fueron diseñados basándose en la secuencia parcial de genes de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178.

Cebador C8HII45178DPf1:

5'-AACTACGACGAGAAGCACTACGTCGAG-3' (SEC ID nº 7)

Cebador CBHII45178DPf3:

5'-AGCTCCTGGATGCCTTTGTCTGGA-3' (SEC ID nº 8)

Cebador CBHII45178DPas1:

5'-AGGCGTTGTAGTTGGCGACGTTG-3' (SEC ID nº 9)

Cebador CBHII45178DPas3:

5'-CAATCGAGAAGCTCGCCGTTGGA-3' (SEC ID nº 10)

[0309] Las amplificaciones primarias estaban compuestas por 2 µl de ADN genómico como modelo, cada uno con 2,5 mM dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 100 pmol de AP2 (Takara Bio Inc., Seta 3-4-1, Otsu, Shiga, 520-2193, Japón), y 10 pmol de cebador CBHII45178DPas1 para la clonación del extremo 5' o 10 pmol de cebador CBHII45178DPf1 para la clonación del extremo 3', 5 µl de 10X de tampón LA PCR Buffer II (Takara Bio Inc., Seta 3-4-1, Otsu, Shiga, 520-2193, Japón), y 2,5 unidades de ADN-polimerasa TakaRa LA Taq (Takara Bio Inc., Seta 3-4-1, Otsu, Shiga, 520-2193, Japón) en un volumen final de 50 µl. Se realizaron las amplificaciones utilizando un termociclador Peltier (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EE.UU.) programadas para pre-desnaturalizar a 94°C durante 1 minuto y 98°C durante 1 minuto; cada uno cinco ciclos a una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos; recocado a 60°C durante 1 minuto, y alargamiento a 72°C durante 2 minutos; 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; recocado a 25°C durante 3 minutos y alargamiento a 72°C durante 2 minutos; quince repeticiones de 2 ciclos a 94°C durante 30 segundos; 62°C durante 1 minuto; y 72°C durante 2 minutos; seguido de 1 ciclo a 94°C durante 30 segundos; 44°C durante 1 minuto; y 72°C durante 2 minutos; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. El bloque de calor pasó entonces a un ciclo de remojo a 4°C.

[0310] Las amplificaciones secundarias estaban compuestas por 2 µl de 20X de producto PCR primario diluido como modelo, cada uno con 2,5 mM dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 100 pmol de AP2, y 10 pmol de cebador CBHII45178DPas3 para la clonación del extremo 5' o 10 pmol de cebador CBHII45178DPf3 para la clonación del extremo 3', 5 µl de 10X tampón LA PCR Buffer II, y 2,5 unidades de ADN-polimerasa TakaRa LA Taq en un volumen final de 50 µl. Las amplificaciones se realizaron utilizando un termociclador Peltier programado para quince repeticiones de 2 ciclos a 94°C durante 30 segundos; 62°C durante 1 minutos; 72°C durante 2 minutos; seguidas de 1 ciclo a 94°C durante 30 segundos; 44°C durante 1 minuto; 72°C durante 2 minutos; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. El bloque de calor pasó entonces a un ciclo de remojo a 4°C.

[0311] Los productos reactivos se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,0% usando 90 mM Tris-borato y 1 mM tampón EDTA (TBE) donde una banda de producto de 600 pb a partir de la reacción de clonación del extremo 3' y una banda de producto de 1,1 kb a partir de la reacción de clonación del extremo 5' se escindieron de los geles, se purificaron utilizando un equipo de purificación ilustra GFX PCR ADN and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB) según las instrucciones del fabricante, y se confirmaron por secuenciación del ADN utilizando un analizador de ADN 3730X (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, EE.UU.).

[0312] En cuanto la secuencia parcial de otro gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 mostró alta identidad (97%) al gen de celobiohidrolasa de *Thielavia hyrcaniae* NN045178, el gen en toda su longitud del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 se clonó usando el mismo par de cebador que la clonación del gen de celobiohidrolasa de *Thielavia hyrcaniae* NN045178.

Ejemplo 4: caracterización de las secuencias genómicas de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 y NN045178 codificando celobiohidrolasas de la familia 6

[0313] La secuencia de nucleótidos del gen en toda su longitud de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 es 1598 pb incluyendo el codón de terminación. La secuencia de proteína deducida de la proteína madura mostró similitud a la exoglucanasa GH6A de *Humicola insolens* (Uniprot: Q9C1S9).

[0314] La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº 2) del gen completo de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 se muestran en la figura 1. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 493 aminoácidos, interrumpido por 2 intrones de 58 bp cada uno. El contenido % G+C del gen y de la secuencia codificante madura es de 65,7% cada uno. Usando el programa de software SignalP (Nielsen et al., 1997, *supra*), se predijo un péptido de señal de 17 residuos. La proteína madura predicha contiene 476 aminoácidos con una masa molecular predicha de 50.0 kDa.

[0315] Se determinó un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como se implementó en el programa Needle de EMBOSS con una penalización de apertura de gap de 10, una penalización de extensión de gap de 0,5, y la matriz EBLOSUM62. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de

Thielavia hyrcaniae NN045097 que codifica el polipéptido maduro comparte un 84,1% y 83,7% de identidad (excluyendo los gaps) con las secuencias de aminoácidos deducidas de dos proteínas enzimáticas lignocelulósicas (WO 2008/095033; números de registro de GeneSeqP ASR94104 y ASR94110, respectivamente).

5 [0316] La secuencia de nucleótidos del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 en toda su longitud es 1584 bp incluyendo el codón de terminación. La secuencia de proteína deducida de la proteína madura mostró similitud a la exoglucanasa GH6A de *Humicola insolens* (Uniprot: Q9C1S9).

10 [0317] La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº 4) del gen completo de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 se muestran en la figura 2. El fragmento genómico codifica un polipéptido de 487 aminoácidos, interrumpido por 2 intrones de 59 y 61 bp. El contenido % G+C del gen y la secuencia codificante madura son 65.4% cada uno. Usando el programa de software SignalP (Nielsen et al., 1997, *supra*), se predijo un péptido de señal de 17 residuos. La proteína madura predicha contiene 470 aminoácidos con una masa molecular predicha de 49.5 kDa.

15 [0318] Se determinó un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como se implementó en el programa Needle de EMBOSS con penalización de apertura de gap de 10, penalización de extensión de gap de 0,5, y la matriz EBLOSUM62. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 que codifica el polipéptido maduro comparte un 85.3% y 83.6% de identidad (excluyendo gaps) con las secuencias de aminoácidos deducidas de dos proteínas enzimáticas lignocelulósicas (WO 2008/095033; números de registro de GeneSeqP ASR94104 y ASR94110, respectivamente).

25 **Ejemplo 5: clonación del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae***

[0319] Se diseñaron dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados posteriormente para que el PCR amplificara el gen de celobiohidrolasa de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 a partir del ADN genómico preparado en el ejemplo 2. Se usó un equipo de clonación IN-FUSION® CF Dry-down Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE.UU.) para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pPFJO355, sin necesidad de digestión de restricción y ligamiento. El vector de expresión pPFJO355 contiene el promotor de alfa-amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y el terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Además pPFJO355 tiene secuencias derivadas pUC18 para la selección y propagación en *E. coli*, y un gen *pyrG*, que codifica una decarboxilasa de orotidina derivada de *Aspergillus nidulans* para la selección de una cepa de *Aspergillus* mutante transformante de un *pyrG*.

35 H_45178_IFNbam:
5'-ACACAACCTGGGGATCCACCATGGCCAAGAAGCTCCTTCTCACC-3' (SEC ID nº 11)
H_45178_IFCbgI:
5'-GTCAACCTCTAGATCTCTAAAAAGGAGGGTTGGCGTTGG-3' (SEC ID nº 12)

40 Las letras en negrita representan la secuencia codificante. La secuencia restante es homóloga a los lugares de inserción de pPFJO355.

45 [0320] Se usaron diez picomoles de cada uno de los cebadores anteriores en un PCR compuesto por ADN genómico de *Thielavia hyrcaniae* NN045178, 10 µl de 5X tampón GC (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 1,5 µl de DMSO, cada uno 2,5 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, y 1 unidad de ADN-polimerasa PHUSION™ High-Fidelity (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) en un volumen final de 50 µl. La amplificación fue realizada utilizando un termociclador Peltier programado para 1 ciclo a 98°C durante 1 minuto; 5 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 15 segundos, recocido a 63°C durante 30 segundos, con un aumento de 1°C por ciclo y alargamiento a 72°C durante 80 segundos; y otros 25 ciclos cada uno a 98°C durante 15 segundos y a 72°C durante 80 segundos; extensión final a 72°C durante 10 minutos. El bloque de calor pasó entonces a un ciclo de remojo a 4°C.

55 [0321] Los productos reactivos se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,0% usando el tampón TBE donde una banda de producto aproximadamente 1,8 kb se escindió del gel, y se purificó utilizando un equipo de purificación ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit según las instrucciones del fabricante.

[0322] El plásmido pPFJO355 se digirió con *Bam* I y *Bgl* II, se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,0% usando un tampón TBE, y se purificó utilizando un equipo de purificación ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit según las instrucciones del fabricante.

60 [0323] El fragmento de gen y el vector digerido se ligaron entre sí utilizando un equipo de clonación IN-FUSION® CF

Dry-down PCR Cloning Kit dando como resultado pCBHII45178 (figura 3) donde la transcripción del gen de celobiohidrolasa estaba bajo el control del promotor de alfa-amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*. En resumen, se agregaron 30 ng de pPFJO355 digerido con *Bam* HI y *Bgl* II, y 80 ng del producto de PCR purificado del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 a un frasco de reacción y se resuspendieron en un volumen final de 10 µl con adición de agua desionizada. La reacción fue incubada a 37°C durante 15 minutos y luego a 50°C durante 15 minutos. Se usaron tres µl de la reacción para transformar las 10 células más competentes de *E. coli* (TIANGEN Biotech (Beijing) Co. Ltd., Pekín, China). Se detectó un transformante de *E. coli* que contiene pCBHII45178 a través de la colonia PCR y se preparó plásmido de ADN utilizando un equipo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU.). La inserción del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 en pCBHII45178 se confirmó mediante secuenciación del ADN utilizando un analizador de ADN 3730XL (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, EE.UU.).

[0324] Se clonó el mismo fragmento de PCR en el vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) utilizando un sistema de vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) para generar pGEM-T-CBHII45178 (figura 4). La inserción del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 en T-CBHII45178 se confirmó mediante secuenciación del ADN como anteriormente. Se depositó *E. coli* T-CBHII45178 con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ por sus siglas en alemán) el 20 de mayo de 2009 y se le asignó el número de registro DSM 22599.

Ejemplo 6: clonación de un gen de celobiohidrolasa de la familia 6 a partir de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 y construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae*

[0325] Se realizó la clonación del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 según el mismo método descrito en el ejemplo 5.

[0326] Se usaron los dos cebadores oligonucleótidos sintéticos (H_45178_IFNbam y H_45178_IFCbgI) descritos en el ejemplo 5 para la amplificación de PCR del gen completo de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097.

[0327] Se usaron diez picomoles de cada uno de los cebadores anteriores en un compuesto de PCR de ADN genómico de *Thielavia hyrcaniae* NN045097, 10 µl de 5X tampón GC, 1,5 µl de DMSO, 2,5 mM cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, y 1 unidad de ADN-polimerasa PHUSION™ High-Fidelity en un volumen final de 50 µl. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador Peltier programado para 1 ciclo a 98°C durante 1 minuto; 10 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 15 segundos, recocido a 62°C durante 30 segundos, con un aumento de 1°C por ciclo y alargamiento a 72°C durante 80 segundos; y otros 25 ciclos cada uno a 98°C durante 15 segundos y 72°C durante 80 segundos; extensión final a 72°C durante 10 minutos. El bloque de calor pasó entonces a un ciclo de remojo a 4°C.

[0328] Los productos reactivos se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,0% usando un tampón TBE donde una banda de producto de aproximadamente 1,8 kb se escindió del gel, y se purificó utilizando un equipo de purificación ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit según las instrucciones del fabricante.

[0329] El plásmido pPFJO355 se digirió con *Bam* I y *Bgl* II, se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa a 1,0% usando un tampón TBE, y se purificó utilizando un equipo de purificación ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit según las instrucciones del fabricante.

[0330] El fragmento del gen y el vector digerido se ligaron entre sí utilizando un equipo de clonación IN-FUSION® CF Dry-down PCR Cloning Kit dando como resultado pCBHII45097 (figura 5) donde la transcripción del gen de celobiohidrolasa estaba bajo el control del promotor de alfa-amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*. En resumen, se añadieron 30 ng de pPFJO355 digeridos con *Bam* I y *Bgl* II y 80 ng del producto de PCR purificado del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 a un frasco de reacción y se resuspendieron hasta un volumen final de 10 µl con adición de agua desionizada. La reacción se incubó a 37°C durante 15 minutos y luego a 50°C durante 15 minutos. Se usaron tres µl de la reacción para transformar las 10 células más competentes de *E. coli*. Se detectó un transformante de *E. coli* que contiene pCBHII45097 a través de la colonia de PCR y se preparó plásmido de ADN utilizando un equipo QIAprep Spin Miniprep Kit. La inserción del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 en pCBHII45178 se confirmó mediante secuenciación del ADN usando un analizador de ADN 3730XL.

[0331] Se clonó el mismo fragmento de PCR en el vector pGEM-T utilizando un Sistema de Vector pGEM-T para generar pGEM-T-CBHII45097 (figura 6). La inserción del gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 en pGEM-T-CBHII45097 se confirmó mediante secuenciación del ADN. Se depositó *E. coli* T-CBHII45097 con Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el 20 de mayo de 2009 y se le asignó el

número de registro DSM 22598.

Ejemplo 7: expresión de los genes de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y NN45097 en *Aspergillus oryzae* HowB101

[0332] Se prepararon los protoplastos de *Aspergillus oryzae* HowB101 (WO 95/35385) según el método de Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Se usaron tres µg de pCBHII45178 o pCBHII45097 para transformar los protoplastos de *Aspergillus oryzae* HowB101.

[0333] La transformación de *Aspergillus oryzae* HowB101 con pCBHII45178 o pCBHII45097 dio como resultado aproximadamente 50 transformantes cada uno. Cuatro transformantes fueron aislados a partir de cada transformación en placas de medio mínimo individuales.

[0334] Los cuatro transformantes a partir de cada transformación se inocularon por separado en 3 ml de medio YPM en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 30°C con agitado a 150 r.p.m. Después de 3 días de incubación, se analizaron 20 µl de sobrenadante de cada cultivo en un gel NUPAGE® NOVEX® 4-12% Bis-Tris con MES (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El gel resultante se manchó con INSTANTBLUE™ (Expedeon Ltd., Babraham Cambridge, GB). Los perfiles de SDS-PAGE del cultivo mostraron que la mayoría de los transformantes produjeron una gran banda proteínica en aproximadamente 70 kDa para ambos genes. Las cepas de expresión que contienen el gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045178 y el gen de celobiohidrolasa de la familia 6 de *Thielavia hyrcaniae* NN045097 se designaron EXP02989 y EXP03004, respectivamente.

[0335] Se lavó un transformante oblicuo para cada cepa de expresión, designados transformante 4 de EXP02989 y transformante 16 de EXP03004, con 10 ml de medio YPM y se inoculó cada cepa en un matraz de 2 litros que contiene 400 ml de medio YPM para generar caldo para la caracterización de cada enzima. Se cosecharon los cultivos al tercer día y se filtraron utilizando una membrana DURAPORE® de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

Ejemplo 8: caracterización de la celobiohidrolasa CEL6A de *Thielavia hyrcaniae* NN045178

[0336] **Ensayo de actividad en PASC.** Se preparó una solución de lodo líquido de materia prima PASC humedeciendo 5 g de AVICEL® (JRS Pharma LP, Patterson, NY, EE.UU.) con agua, seguido de la adición de 150 ml de 85% ácido de ácido ortofosfórico a temperatura muy fría. Se agitó lentamente la suspensión en un baño de hielo durante 1 hora. Luego se añadieron 500 ml de acetona a temperatura muy fría durante el agitado. Se filtró el lodo líquido usando MIRACLOTH® (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.) y luego se lavó tres veces con 100 ml de acetona a temperatura muy fría (tan escurrido como fuera posible después de cada lavado). Finalmente, el lodo líquido filtrado se lavó dos veces con 500 ml de agua, y se escurrió nuevamente tan seco como fue posible después de cada lavado. Se mezcló el PASC con agua desionizada hasta alcanzar un volumen total de 500 ml a una concentración de 10 g/litro, se mezcló hasta conseguir la homogeneidad (utilizando un homogenizador ULTRA-TURRAX® Homogenizer, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE.UU.), y se almacenó en un frigorífico hasta un mes.

[0337] Se diluyó la solución madre de PASC con 50 mM de un tampón de acetato sódico a pH 5,0 hasta obtener una concentración de 2 g/litro, y se usó como sustrato. Para obtener 150 µl de solución madre PASC, se añadieron 20 µl de muestra de enzima y la mezcla reactiva se incubó durante 60 minutos con un agitado a 850 r.p.m. Al final de la incubación, se añadieron 50 µl de 2% NaOH para parar la reacción. La mezcla reactiva se centrifugó a 1,000 x g. Los azúcares liberados se midieron mezclando primero 10 µl de la mezcla reactiva con 90 µl de 0,4% NaOH, seguido de 50 µl de 1,5% hidrácido de ácido p-hidroxibenzoico en 2% NaOH (PHBAH, Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, EE.UU.). La mezcla se hirvió a 100°C durante 5 minutos, y luego se transfirieron 100 µl a una placa de microtitulación para una lectura de absorbancia a 410 nm (Spectra Max M2, Molecular devices Sunnyvale, CA, EE.UU.). Se realizaron las formas preliminares omitiendo el PASC en el paso de hidrólisis, y sustituyendo el hidrolizado con un tampón en el paso de determinación de azúcar.

[0338] **Perfil de pH.** En una placa de microtitulación, se mezclaron 20 µl de cada celobiohidrolasa (EXP02989 o EXP03004) con 120 µl de tampón (100 mM ácido succínico, HEPES, CHES, o CAPSO, y 1 mM CaCl₂, 150 mM KCl y 0.01% TRITON® X-100; pH ajustado con NaOH y HCl) a pH 3, 4, 5, 6, 7 o 8, seguido de la adición de 30 µl de 10g/litro PASC. Se colocaron las mezclas en el hielo antes de la reacción. Los ensayos se iniciaron transfiriendo las placas de microtitulación a un termomezclador EPPENDORF® (Eppendorf, Hauppauge, NY, EE.UU.), que se estableció a 50°C, y se incubó durante 60 minutos con agitado a 850 r.p.m. Al final de la incubación, se añadieron 50 µl de 2% NaOH para parar las reacciones. Las mezclas de reacción se centrifugaron a 1,000 x g. Los azúcares liberados se midieron como se ha descrito anteriormente.

[0339] Los resultados mostrados en la figura 7 indicaron que las celobiohidrolasas poseen actividad en un amplio rango de pH desde pH 3 hasta 11. El pH óptimo para cada celobiohidrolasa estaba entre pH 5 y 6.

[0340] **Estabilidad del pH.** Se mezcló una muestra de 40 µl de cada celobiohidrolasa (EXP02989 o EXP03004) con 160 µl de 100 mM de tampón (a pH 4, 5, 6, 7, o 8: 100 mM ácido succínico, HEPES, CHES, CAPSO, y 1 mM CaCl₂, 150 mM KCl y 0.01% TRITON® X-100, pH ajustado con NaOH y HCl) y se incubó a 50°C con agitado a 850 r.p.m. Se extrajeron muestras de 30 µl y se colocaron en el hielo en los minutos 0, 10, 30, 60 y 110. A continuación se añadieron 150 µl de 2g/litro PASC (en 50 mM de acetato sódico a pH 5.0) a cada muestra, y se incubaron a 50°C, 850 r.p.m. durante 60 minutos. Se mantuvieron treinta µl de cada tampón en su forma preliminar. Los azúcares liberados se midieron como se ha descrito anteriormente.

[0341] Los resultados mostrados en las figuras 8A y 8B indicaron que la celobiohidrolasa EXP02989 tuvo una actividad residual a pH 4, 5, 6, 7, y 8 del 90%, 96%, 96%, 90%, y 39%, respectivamente, mientras que la celobiohidrolasa EXP03004 tuvo una actividad residual a pH 4, 5, 6, 7, y 8 del 89%, 93%, 95%, 75%, y 48%, respectivamente, tras la incubación durante 110 minutos a 50°C.

[0342] **Perfil de temperatura.** Se preincubó un volumen de 150 µl de 2 g de PASC por litro de 50 mM de tampón de acetato sódico a pH 5.0 en un tubo EPPENDORF® a 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100°C. El ensayo se inició añadiendo 20 µl de cada celobiohidrolasa (EXP02989 o EXP03004) seguido de la incubación durante 60 minutos con agitado a 850 r.p.m. Al final de la incubación, se añadieron 50 µl de 2% hidróxido sódico para parar la reacción y se centrifugaron las mezclas de la reacción a 1,000 x g. Los azúcares liberados se midieron como se ha descrito anteriormente.

[0343] Los resultados mostrados en las figuras 9A y 9B indicaron que las celobiohidrolasas estaban activas en un amplio rango de temperatura desde 25 a 80°C y parecían tener actividad óptima a aproximadamente 60°C de temperatura.

[0344] **Estabilidad de temperatura.** Se incubó una muestra de 250 µl de cada celobiohidrolasa (EXP02989 o EXP03004) (diluída con 50 mM de tampón de acetato sódico a pH 5) a 50, 60 y 70°C. Se extrajo una muestra de 20 µl de cada celobiohidrolasa y se colocó en el hielo en los minutos 0, 10, 30, 60 y 110. Posteriormente se añadieron 150 µl de 2 g de PASC por litro de 50 mM acetato sódico a pH 5.0 a cada muestra, y se incubaron a 50°C durante 60 minutos. Al final de la incubación, se añadieron 50 µl de 2% NaOH para parar las reacciones. Las mezclas de reacción se centrifugaron a 1,000 x g. Los azúcares liberados se midieron como se ha descrito anteriormente.

[0345] Los resultados mostrados en las figuras 10A e 10B indicaron que las celobiohidrolasas eran estables a 50°C, menos estables a 60°C, e inestables a 70°C. Las actividades residuales de la celobiohidrolasa EXP02989 eran del 100% a 50°C, del 53% a 60°C y del 40% a 70°C y de la celobiohidrolasa EXP03004 del 100% a 50°C, del 57% a 60°C y del 51% a 70°C tras 60 minutos de incubación.

Depósito de materiales biológicos

[0346] Los siguientes materiales biológicos han sido depositados según las condiciones del tratado de Budapest con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, y se les ha dado el siguiente número de registro:

Cepa	Número de registro	Fecha
<i>E. coli</i> T-CBHII45097	DSM 22598	20 mayo 2009
<i>E. coli</i> T-CBHII45178	DSM 22599	20 mayo 2009

[0347] Las cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendency de esta solicitud de patente para alguien determinado por las leyes de patente extranjeras para estar autorizado a ello. Los depósitos representan cultivos esencialmente puros de las cepas depositadas. Los depósitos están disponibles según sea requerido por las leyes de patente extranjeras en países donde se han solicitado equivalentes de la solicitud del sujeto o su progenie. No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye licencia para poner en práctica la presente invención en derogación de los derechos resultantes de las patentes concedidos por acción gubernamental.

[0348] La presente invención es descrita por los siguientes párrafos numerados:

[1] Un polipéptido aislado con actividad de celobiohidrolasa, seleccionado de un polipéptido con al menos un 90% de

identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[2] El polipéptido del párrafo 1, con al menos un 90% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[3] El polipéptido del párrafo 2, con al menos un 91% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[4] El polipéptido del párrafo 3, con al menos un 92% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[5] El polipéptido del párrafo 4, con al menos un 93% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[6] El polipéptido del párrafo 5, con al menos un 94% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[7] El polipéptido del párrafo 6, con al menos un 95% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[8] El polipéptido del párrafo 7, con al menos un 96% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[9] El polipéptido del párrafo 8, con al menos un 97% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[10] El polipéptido del párrafo 9, con al menos un 98% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[11] El polipéptido del párrafo 10, con al menos un 99% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[12] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-11, que comprende o consiste en la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[13] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-11, que comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.

[14] El polipéptido del párrafo 13, donde el polipéptido maduro son los aminoácidos 18 a 493 de la SEC ID nº 2 o los aminoácidos 18 a 487 de la SEC ID nº 4.

[15] El polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-11, el cual se codifica mediante el polinucleótido contenido en el plásmido pGEM-T-CBHII45097 presente en *E. coli* DSM 22598 o el plásmido pGEM-T-CBHII45178 presente en *E. coli* DSM 22599.

[16] Una composición que comprende el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-15.

[17] Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-15.

[18] Una célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido del párrafo 17 enlazado operativamente a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

[19] Un método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-15, que comprende: (a) cultivar una célula, que en su forma tipo natural produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[20] Un método para producir un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa, que comprende: (a) cultivar la célula huésped del párrafo 19 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[21] Una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-15.

[22] Un método para producir un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa, que comprende: (a) cultivar la planta transgénica o célula de planta del párrafo 21 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[23] Un método para degradar o convertir un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de cualquiera de los párrafos 1-15.

[24] El método del párrafo 23, donde el material celulósico es pretratado.

[25] El método del párrafo 23 o 24, donde la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas celulolíticas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de aumento celulolítico.

[26] El método de cualquiera de los párrafos 23-25, donde la composición enzimática comprende o comprende además una o más (varias) proteínas seleccionadas del grupo consistente en una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

[27] El método del párrafo 26, donde la hemicelulasa es una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una esterasa de acetilmanano, una esterasa de acetixilano, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronoilo, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa.

[28] El método de cualquiera de los párrafos 23-27, que comprende además la recuperación del material celulósico degradado.

[29] El método del párrafo 28, donde el material celulósico degradado es un azúcar.

[30] El método del párrafo 29, donde el azúcar es seleccionado del grupo que consiste en glucosa, xilosa, manosa,

galactosa, y arabinosa.

[31] Un método para producir un producto de fermentación, que comprende: (a) sacarificar un material celulósico con una composición enzimática en la presencia del polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de cualquiera de los párrafos 1-15; (b) fermentar el material celulósico sacarificado con uno o más microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y (c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.

[32] El método de párrafo 31, donde el material celulósico es pretratado.

[33] El método del párrafo 31 o 32, donde la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas celulolíticas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de aumento celulolítico.

[34] El método de cualquiera de los párrafos 31-33, donde la composición enzimática comprende o comprende además una o más (varias) proteínas seleccionadas del grupo consistente en una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swollenina.

[35] El método del párrafo 34, donde la hemicelulasa es una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una esterasa de acetilmanano, una esterasa de acetixilano, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronoilo, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa.

[36] El método de cualquiera de los párrafos 31-35, donde los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente en una sacarificación y fermentación simultáneas.

[37] El método de cualquiera de los párrafos 31-35, donde el producto de fermentación es un alcohol, un ácido orgánico, una cetona, un aminoácido o un gas.

[38] Un método de fermentación de un material celulósico, que comprende: fermentar el material celulósico con uno o varios microorganismos fermentadores, donde el material celulósico se sacarifica con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de cualquiera de los párrafos 1-15.

[39] El método del párrafo 38, donde la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación.

[40] El método del párrafo 39, que comprende además la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

[41] El método de cualquiera de los párrafos 38-40, donde el material celulósico es pretratado antes de la sacarificación.

[42] El método de cualquiera de los párrafos 38-41, donde la composición enzimática comprende una o más (varias) enzimas celulolíticas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de aumento celulolítico.

[43] El método de cualquiera de los párrafos 38-42, donde la composición enzimática comprende o comprende además una o más (varias) proteínas seleccionadas del grupo consistente en una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa y una swollenina.

[44] El método del párrafo 43, donde la hemicelulasa es una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una esterasa de acetilmanano, una esterasa de acetixilano, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronoilo, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa y una xilosidasa.

[45] El método de cualquiera de los párrafos 38-44, donde el producto de fermentación es un alcohol, un ácido orgánico, una cetona, un aminoácido o un gas.

Listado de secuencias

[0349]

<110> Novozymes, Inc. Novozymes A/S Liu, Ye Tang, Lan Harris, Paul Wu, Wenping

<120> Polipéptidos con actividad de celobiohidrolasa y polinucleótidos que codifican la misma

<130> 11623.204-WO

<150> US 61/183,490

<151> 2009-06-02

<160> 12

<170> PatentIn Version 3.5

<210> 1

<211> 1598

<212> ADN

<213> Thielavia hyrcaniae

ES 2 534 078 T3

<400> 1

```

atggccaaga agctccttct caccgcccgc ctcgcggtta ctgccctggc tgetcccatc      60
gtcgaggagc gccagaactg tggtccgctc tggttaagtga ctgcttgatg atctacggtg      120
aaagctgctc gctgacacga cgacttcag gagtcaatgt ggtggccaag ggtggtcggg      180
cgccacctgc tgcgcgtctg gaagcacctg cgtggcccag aaccctggt actcgagtg      240
cctgccaac agccagggtga ccaccaccgc gactagcgct cgcgcctcgt cgtcctcgtc      300
ctcgtcctcg tccaccaagg cgagcaccag cagcaccagc cgcaccaccg tgggcaccac      360
ctcgggtggc accaccactc gtgctagctc cagcaccacc tctcccccg tgcgcacctc      420
ggtcgttccc ggcggtgcca cggccacggc gagtactcgg ggcaaccctc tctccggcgt      480
gcgcctgtgg gccaacgact actacgcctc cgagggtgctg actctcgcca tgccttccct      540
gacggggcgc atggccacca aggcggccgc tgcgcgcaag gtgccagct tccagtggct      600
ggaccgcaac gtcaccatcg acaccctgat ggtcaagact ctgtcccaga tccgcgcgcg      660
caaccaggcc ggtgccaacc ccccgatgc cggtaagttt gagttcgata cttgttact      720
tccaaaagct cggactaacg acatgtgcag cccagctggt ggtctacgac ctcccgcacc      780
gtgactgctc tgcgcgcgc tccaacggcg agttctcgat tgccaacaac ggcgcggcca      840
actacaagtc gtacattgac tcgatccgca agcacctcat cgagtactcg gacatccgca      900
ccattctcgt cattgagccc gactcgatgg ccaacatggt caccaacatg aacgtcgcca      960
agtgcagcaa cgcggccacc acgtaccgcg agctgaccgt ctacgccctc aagcagctga      1020
acctgccccca cgtcgccatg tacctcgacg ccggccacgc cggctggctc ggctggcccg      1080
ccaacatcca gcccgctgcc accctgttcg ccggcatcta cagcgacgct ggcaagcccg      1140

cctcggtcgg cggtttgccc accaacgtgg ccaactacaa cgcctggagc ctgtcgtcgg      1200
cgccgtcgta cagcagcccc aacgccaaact acgacgagaa gcactacgtc gaggccttg      1260
ccccgctcct ccaggcgggc ggcttccccg ccaagttcat caccgacacg ggccgcaacg      1320
gcaagcagcc cagggggcag agcgcgtggg gcgactgggt caacgtcaag ggcaccggct      1380
tcggtgtccg cccgacctcg gagacgggccc acgacctcct cgacgccttc gtctgggtca      1440
agcccgggtg cgagtcggac ggcaccagcg acaccagcgc cgcgcgtac gactaccact      1500
gcggtctgtc ggatgccctc cagcctgctc ccgaggtgg cactgggttc caggcctact      1560
ttgagcagct gctcaccaac gccaacctc ctttttag      1598

```

5

<210> 2

<211> 493

<212> PRT

<213> Thielavia hyrcaniae

10

<400> 2

ES 2 534 078 T3

Met Ala Lys Lys Leu Leu Leu Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ile Val Glu Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ser Val Trp Ser
20 25 30

Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Ser Gly Ala Thr Cys Cys Ala Ser Gly
35 40 45

Ser Thr Cys Val Ala Gln Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Asn
50 55 60

Ser Gln Val Thr Thr Thr Ala Thr Ser Ala Arg Ala Ser Ser Ser Ser
65 70 75 80

Ser Ser Ser Ser Ser Thr Lys Ala Ser Thr Ser Ser Thr Ser Arg Thr
85 90 95

Thr Val Gly Thr Thr Ser Val Gly Thr Thr Thr Arg Ala Ser Ser Thr
100 105 110

Thr Thr Ser Pro Pro Val Val Thr Ser Val Val Pro Gly Gly Ala Thr
115 120 125

Ala Thr Ala Ser Tyr Ser Gly Asn Pro Phe Ser Gly Val Arg Leu Trp
130 135 140

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

Leu Thr Gly Ala Met Ala Thr Lys Ala Ala Ala Val Ala Lys Val Pro

ES 2 534 078 T3

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

ES 2 534 078 T3

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

Gly Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ala Arg Tyr Asp Tyr His Cys Gly Leu
450 455 460

Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala Pro Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala
465 470 475 480

Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr Asn Ala Asn Pro Pro Phe
485 490

<210> 3

<211> 1584

<212> ADN

5 <213> Thielavia hyrcaniae

<400> 3

ES 2 534 078 T3

atggccaaga agctccttct caccgccgcc ctgcgggcct ctgccctggc tgetcccatt	60
gtcgaggagc gccagaactg cggctccgtc tggttaagtga tcgttcgagg attccatggt	120
gaaagctgct cgctcacacg atgctctcca ggagtcaatg tggtaggaac gggtaggtcgg	180
gcgccacctg ctgcgcgtct ggaagcacct gcgtagccca gaacccctgg tactcgcagt	240
gcctgcccag cagccaggtg accaccacca cgactagcgc tcgcgcctcg tcgtcgtctt	300
cgctcgtccac ccgggcgagc accagcagca ccagccgcac cacctcgggtg ggcaccacca	360
cccgtagctag ctccacgacc acctcggccc ctggcgctac gtccagcggt cctggcggtg	420
ctacggccac ggccagctac tcgggcaacc ccttctccgg ggtgcgctg tgggccaacg	480
actactacgc ctccgaggtg tcgaccctcg ccactgcctc cctgacgggc gccatggcca	540
ccaaggcggc cgccgtcgcc aagggtcccca gcttcagtg gctggaccgc aacgtcacca	600
tcgacaccct gatggtcaag actctgtccc agatccgggc cgccaaccag gccggtgcca	660
acccccgta tgccggtaag cttcgactcg atcttgtctg cctgctctca agtgcctgaa	720
ctaagacgat gcgcagccca gctggtggtc tacgacctcc ccgaccgtga ctgcgctgcc	780
gccgcctcca acggcgagtt ctcgattgcc aacaacggcg cggccaacta caagtcgtac	840
atcgactcga tccgcaagca cctcatcgag tactcggaca tccgcacat cctggttatt	900
gagcccgatt cgatggccaa catggtcacc aacatgaacg tcgccaaagt cagcaacgcc	960
gccacgacct accgcgagct gaccatctac gctctcaagc agctgaacct gccccacgc	1020
gccatgtacc tcgacgccgg ccacgccggc tggtctgggt ggcccgcga catccagccc	1080
gctgctaccc tggtcgccgg catctacaac gacgtggga agcccgctc ggtccgtggt	1140
ctggccacca acgtcgccaa ctacaacgcc tggagcctgt cctcgcccc gtcgtacacg	1200
acccccaaag ccaactacga cgagaagcac tacgtcgagg cctttgcccc gcttctctcg	1260
gcccgtggct tccccgcaa gttcatcacc gacactggcc gcaacggcaa gcagcccacc	1320
ggccagagcc agtggggcga ttggtgcaac gtcaagggca ccggttcgg tggtccgccg	1380
acctccgaga cggggcacga gctcctggat gcctttgtct gggtaagcc cggtaggcgag	1440
tccgacggta ccagcgacac cagcgctgcc cgctacgact accactgcgg tctgtcggt	1500
gccctocagc ccgtccccga ggccggcacg tggttccagg cctactttga acagctctc	1560
accaacgccca acctccttt ttag	1584

<210> 4

<211> 487

<212> PRT

<213> Thielavia hyrcaniae

<400> 4

ES 2 534 078 T3

Met Ala Lys Lys Leu Leu Leu Thr Ala Ala Leu Ala Ala Ser Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Ile Val Glu Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ser Val Trp Ser
 20 25 30

Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Ala Thr Cys Cys Ala Ser Gly
 35 40 45

Ser Thr Cys Val Ala Gln Asn Pro Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ser
 50 55 60

Ser Gln Val Thr Thr Thr Thr Thr Ser Ala Arg Ala Ser Ser Ser Ser
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Thr Arg Ala Ser Thr Ser Ser Thr Ser Arg Thr Thr Ser
 85 90 95

Val Gly Thr Thr Thr Arg Ala Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Pro Gly
 100 105 110

Val Thr Ser Ser Val Pro Gly Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ser Tyr Ser
 115 120 125

Gly Asn Pro Phe Ser Gly Val Arg Leu Trp Ala Asn Asp Tyr Tyr Ala
 130 135 140

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

Thr Lys Ala Ala Ala Val Ala Lys Val Pro Ser Phe Gln Trp Leu Asp
 165 170 175

ES 2 534 078 T3

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

ES 2 534 078 T3

435 440 445
 Ala Ala Arg Tyr Asp Tyr His Cys Gly Leu Ser Asp Ala Leu Gln Pro
 450 455 460
 Ala Pro Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu
 465 470 475 480
 Thr Asn Ala Asn Pro Pro Phe
 485

5 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Thielavia hyrcaniae
 10 <400> 5
 tgcctcgat ccgtcgatct gtcgc 25
 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Thielavia hyrcaniae
 15 <400> 6
 tcagccaccg tggcttgat ccca 24
 20 <210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Thielavia hyrcaniae
 25 <400> 7
 aactacgacg agaagcacta cgtcgag 27
 30 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Thielavia hyrcaniae
 35 <400> 8
 agctcctgga tgcctttgct tgga 24
 40 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Thielavia hyrcaniae
 45 <400> 9
 aggcgttgta gttggcgacg ttg 23
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Thielavia hyrcaniae
 <400> 10
 caatcgagaa ctcgccgttg ga 22

ES 2 534 078 T3

<210> 11
<211> 43
<212> ADN
5 <213> Thielavia hyrcaniae

<400> 11
acacaactgg ggatccacca tggccaagaa gtccttctc acc 43

10 <210> 12
<211> 39
<212> ADN
<213> Thielavia hyrcaniae

15 <400> 12
gtcaccctct agatctctaa aaaggagggt tggcgttg 39

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado con actividad de celobiohidrolasa, seleccionado a partir de un polipéptido con al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID nº 2 o SEC ID nº 4.
- 10 2. Polipéptido según la reivindicación 1, que es codificado por el polinucleótido contenido en el plásmido pGEM-T-CBHII45097 contenido en *E. coli* DSM 22598 o en el plásmido pGEM-T-CBHII45178 contenido en *E. coli* DSM 22599.
3. Composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 1 o 2.
4. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según la reivindicación 1 o 2.
- 15 5. Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4 enlazado operativamente a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
6. Método para producir un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa, que comprende:
- 20 (a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 5 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
(b) recuperar el polipéptido.
7. Planta transgénica, parte de planta o célula vegetal transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido según la reivindicación 1 o 2.
- 25 8. Método para producir el polipéptido con actividad de celobiohidrolasa, que comprende:
- (a) cultivar la planta transgénica o célula vegetal de la reivindicación 7 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- 30 (b) recuperar el polipéptido.
9. Método para degradar o convertir un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad de celobiohidrolasa de la reivindicación 1 o 2.
- 35 10. Método según la reivindicación 9, que comprende además recuperar el material celulósico degradado.
11. Método para producir un producto de fermentación, que comprende:
- 40 (a) sacarificar un material celulósico con una composición enzimática en presencia del polipéptido con actividad de celobiohidrolasa según la reivindicación 1 o 2;
(b) fermentar el material celulósico sacarificado con uno o varios microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y
(c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.
- 45 12. Método de fermentación de un material celulósico, que comprende: fermentar el material celulósico con uno o varios microorganismos fermentadores, donde el material celulósico es sacarificado con una composición enzimática en presencia de un polipéptido con actividad de celobiohidrolasa según la reivindicación 1 o 2.
- 50 13. Método según la reivindicación 12, donde la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación.
14. Método según la reivindicación 13, que comprende además la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

```

      M A K K L L L T A A L A A T A L A A P I
1  ATGGCCAAGA AGCTCCTTCT CACCGCCGCC CTCGCGGCTA CTGCCCTGGC TGCTCCCATC
   V E E R Q N C G S V W
61  GTCGAGGAGC GCCAGAACTG TGGCTCCGTC TGGTAAAGTGA CTGCTTGATG ATCTACGGTG
      S Q C G G Q G W S G .
121 AAAGCTGCTC GCTGACACGA CACTTCCAG GAGTCAATGT GGTGGCCAAG GGTGGTCGGG
   . A T C C A S G S T C V A Q N P W Y S Q C .
181 CGCCACCTGC TGC GCGTCTG GAAGCACCTG CGTGGCCAG AACCCCTGGT ACTCGCAGTG
   . L P N S Q V T T T A T S A R A S S S S S .
241 CCTGCCCAAC AGCCAGGTGA CCACCACCGC GACTAGCGCT CGCGCCTCGT CGTCCTCGTC
   . S S S S T K A S T S S T S R T T V G T T .
301 CTCGCTCTCG TCCACCAAGG CGGACACGAG CAGCACCCAG CGCACCCCG TGGGCACCAAC
   . S V G T T T R A S S T T T S P P V V T S .
361 CTCGTGGGGC ACCACCACTC GTGCTAGCTC CACGACCACC TCTCCCCCGG TCCTCACCTC
   . V V P G G A T A T A S Y S G N P F S G V .
421 GGTGCTTCCC GGCGGTGCCA CGGCCACGCG GAGCTACTCG GGCAACCCCT TCTCCGGCGT
   . R L W A N D Y Y A S E V S T L A M P S L .
481 GCGCTGTGGC GCCAAGCACT ACTACGCCTC CGAGGTGTG ACTCTCGCCA TGCCTTCCCT
   . T G A M A T K A A A V A K V P S F Q W L .
541 GACGGCGGCC ATGGCCACCA AGGCGGCCGC TGTGCGCAAG GTGCCCAGCT TCCAGTGGCT
   . D R N V T I D T L M V K T L S Q I R A A .
601 GGACCGCAAC GTCACCATCG ACACCCTGAT GGTCAAGACT CTGTCCCAGA TCCGCGCCGC
   . N Q A G A N P P Y A
661 CAACCAGGCC GGTGCCAACC CCCCCTATGC CGGTAAGTTT GAGTTCGATA CTTGTTCACT
      A Q L V V Y D L P D R .
721 TCCAAAAGCT CGGACTAACG ACATGTGCAG CCCAGCTGGT GGTCTACGAC CTCCCCGACC
   . D C A A A A S N G E F S I A N N G A A N .
781 GTGACTGCGC TGCCGCGGCC TCCAACGGCG AGTTCTCGAT TGCCAACAAC GGCGCGGCCA
   . Y K S Y I D S I R K H L I E Y S D I R T .
841 ACTACAAGTC GTACATTGAC TCGATCCGCA AGCACCTCAT CGAGTACTCG GACATCCGCA
   . I L V I E P D S M A N M V T N M N V A K .
901 CCATTCTCGT CATTGAGCCC GACTCGATGG CCAACATGGT CACCAACATG AACGTCGCCA
   . C S N A A T T Y R E L T V Y A L K Q L N .
961 AGTGCAGCAA CGCGGCCACC ACGTACCGCG AGCTGACCGT CTACGCCCTC AAGCAGCTGA
   . L P H V A M Y L D A G H A G W L G W P A .
1021 ACCTGCCCCA CGTCGCCATG TACCTCGACG CCGGCCACGC CGGCTGGCTC GGCTGGCCCG
   . N I Q P A A T L F A G I Y S D A G K P A .
1081 CCAACATCCA GCCCGCTGCC ACCCTGTTCG CCGGCATCTA CAGCGACGCT GGCAAGCCCG
   . S V R G L A T N V A N Y N A W S L S S A .
1141 CCTCGGTCCG CGGTTTGGCC ACCAACGTGG CCAACTACAA CGCCTGGAGC CTGTCTGTCG
   . P S Y T S P N A N Y D E K H Y V E A F A .
1201 CGCCGTCGTA CACGAGCCCC AACGCCAAGT ACGACGAGAA GCACTACGTC GAGGCCTTTG
   . P L L Q A A G F P A K F I T D T G R N G .
1261 CCCCGCTCCT CCAGGCGGCC GGCTTCCCCG CCAAGTTCAT CACCGACACG GGCCGCAACG
   . K Q P T G Q S A W G D W C N V K G T G F .
1321 GCAAGCAGCC CACGGGCCAG AGCGCGTGGG GCGACTGGTG CAACGTCAAG GGCACCGGCT
   . G V R P T S E T G H D L L D A F V W V K .
1381 TCGGTGTCCG CCCGACCTCG GAGACGGGCC ACGACCTCCT CGACGCCTTC GTCTGGGTCA
   . P G G E S D G T S D T S A A R Y D Y H C .
1441 AGCCCGGTGG CGAGTCGGAC GGCACCAGC ACACCAGCGC CGCCCCTAC GACTACCACT
   . G L S D A L Q P A P E A G T W F Q A Y F .
1501 GCGTCTGTGC GGATGCCCTC CAGCCTGCTC CCGAGGCTGG CACGTGGTTC CAGGCCTACT
   . E Q L L T N A N P P F *
1561 TTGAGCAGCT GCTCACCAAC GCCAACCCCT CTTTTTAG

```

FIG. 1

```

      M A K K L L L T A A L A A S A L A A P I
1  ATGGCCAAGA AGCTCCTTCT CACCGCCGCC CTCGCGGCCT CTGCCCTGGC TGCTCCCATT
      V E E R Q N C G S V W
61  GTCGAGGAGC GCCAGAACTG CGGCTCCGTC TGGTAAGTGA TCGTTCGAGG ATTCCATGGT
      S Q C G G N G W S G
121 GAAAGCTGCT CGCTCACACG ATGCTCTCCA GGAGTCAATG TGGTGGCAAC GGGTGGTCGG
      A T C C A S G S T C V A Q N P W Y S Q C
181 GCGCCACCTG CTGCGCGTCT GGAAGCACCT GCGTAGCCCA GAACCCCTGG TACTCGCAGT
      L P S S Q V T T T T T S A R A S S S S S
241 GCCTGCCAG CAGCCAGGTG ACCACCACCA CGACTAGCGC TCGCGCCTCG TCGTCGTCTT
      S S T R A S T S S T S R T T S V G T T T
301 CGTCGTCCAC CCGGGCGAGC ACCAGCAGCA CCAGCCGCAC CACCTCGGTG GGCACCACCA
      R A S S T T T S A P G V T S S V P G G A
361 CCCGTGCTAG CTCCACGACC ACCTCGGCCC CTGGCGTCAC GTCCAGCGTT CCTGGCGGTG
      T A T A V A K V N P F S G V R L W A N D
421 CTACGGCCAC GGCCAGCTAC TCGGGCAACC CTTTCTCCGG GGTGCGCCTG TGGGCCAACG
      Y Y A S E V S T L A M P S L T G A M A T
481 ACTACTACGC CTCGAGGTG TCGACCCTCG CCATGCCTTC CCTGACGGGC GCCATGGCCA
      K A A A V A K V P S F Q W L D R N V T I
541 CCAAGGCGGC CGCCGTCGCC AAGGTCCCCA GCTTCCAGTG GCTGACCGC AACGTCACCA
      D T L M V K T L S Q I R A A N Q A G A N
601 TCGACACCCT GATGGTCAAG ACTCTGTCCC AGATCCGGGC CGCCAACCAG GCCGGTGCCA
      P P Y A
661 ACCCCCCGTA TGCCGGTAAG CTTGCACTCG ATCTTGCTCTG CCTGCTCTCA AGTGCTCGAA
      A Q L V V Y D L P D R D C A A
721 CTAAGACGAT GCGCAGCCCA GCTGGTGGTC TACGACCTCC CCGACCGTGA CTGCGCTGCC
      A A S N G E F S I A N N G A A N Y K S Y
781 GCCGCTTCCA ACGGCGAGTT CTCGATTGCC AACAACGGCG CGGCCAACTA CAAGTCGTAC
      I D S I R K H L I E Y S D I R T I L V I
841 ATCGACTCGA TCCGCAAGCA CCTCATCGAG TACTCGGACA TCCGACCAT CCTGGTTATT
      E P D S M A N M V T N M N V A K C S N A
901 GAGCCCGATT CGATGGCCAA CATGGTCACC AACATGAACG TCGCCAAGTG CAGCAACGCC
      A T T Y R E L T I Y A L K Q L N L P H V
961 GCCACGACCT ACCGCGAGCT GACCATCTAC GCTCTCAAGC AGCTGAACCT GCCCCACGTC
      A M Y L D A G H A G W L G W P A N I Q P
1021 GCCATGTACC TCGACGCCGG CCACGCCGGC TGGCTCGGCT GGCCCGCCAA CATCCAGCCC
      A A T L F A G I Y N D A G K P A S V R G
1081 GCTGCTACCC TGTCGCGCGG CATCTACAAC GACGCTGGCA AGCCCGCCTC GGTCCGTGGT
      L A T N V A N Y N A W S L S S A P S Y T
1141 CTGGCCACCA ACGTCGCCAA CTACAACGCC TGGAGCCTGT CCTCGGCCCC GTCGTACACG
      T P N A N Y D E K H Y V E A F A P L L S
1201 ACCCCCAACG CCAACTACGA CGAGAAGCAC TACGTCGAGG CCTTTGCCCC GCTTCTCTCG
      A A G F P A K F I T D T G R N G K Q P T
1261 GCCGCTGGCT TCCCGGCCAA GTTCATCACC GACACTGGCC GCAACGGCAA GCAGCCCACC
      G Q S Q W G D W C N V K G T G F G V R P
1321 GGCCAGAGCC AGTGGGGCGA TTGGTGCAAC GTCAAGGGCA CCGGCTTCGG TGTCCGCCCG
      T S E T G H E L L D A F V W V K P G G E
1381 ACCTCCGAGA CGGGCCACGA GCTCCTGGAT GCCTTTGTCT GGGTCAAGCC CGGTGGCGAG
      S D G T S D T S A A R Y D Y H C G L S D
1441 TCCGACGGTA CCAGCGACAC CAGCGCTGCC CGCTACGACT ACCACTGCGG TCTGTGCGAT
      A L Q P A P E A G T W F Q A Y F E Q L L
1501 GCCCTCCAGC CGCTCCCGA GGCCGGCACG TGGTTCCAGG CCTACTTTGA ACAGCTCCTC
      T N A N P P F *
1561 ACCAACGCCA ACCCTCCTTT TTAG

```

FIG. 2

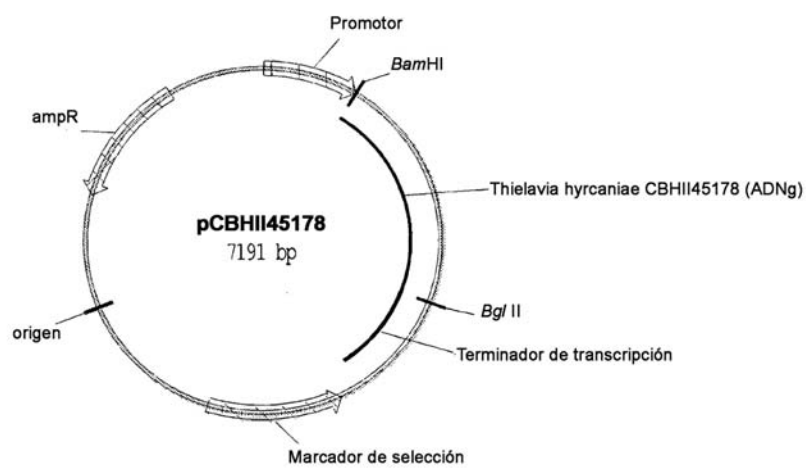


FIG. 3

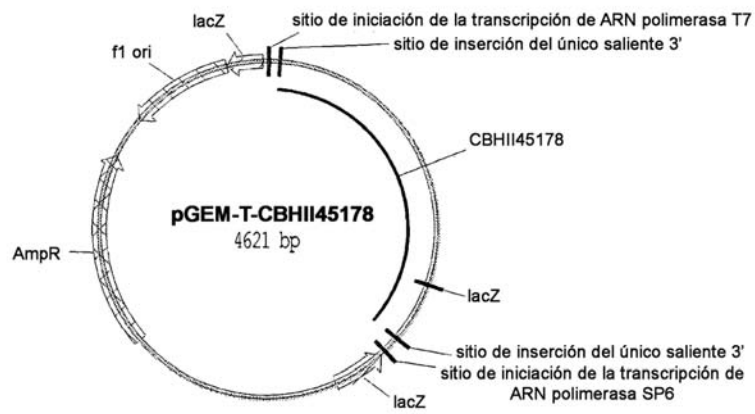


FIG. 4

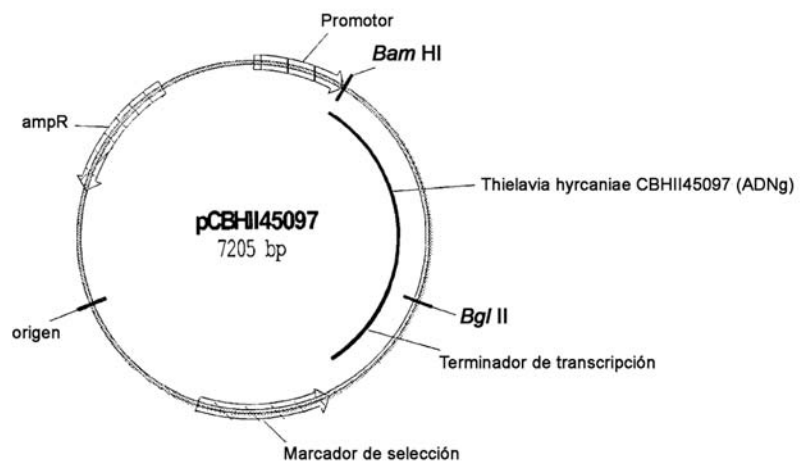


FIG. 5

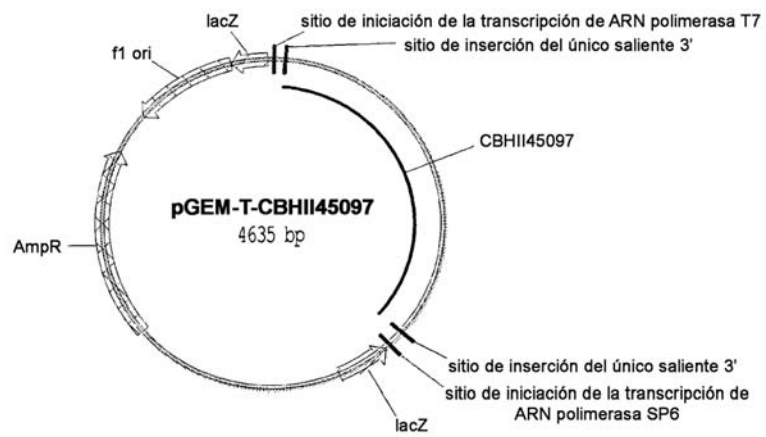


FIG. 6

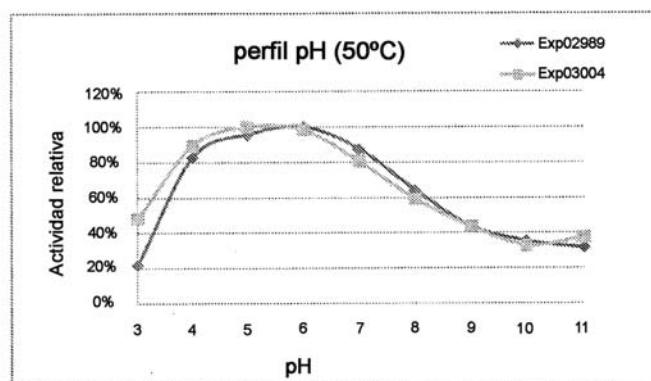


FIG. 7

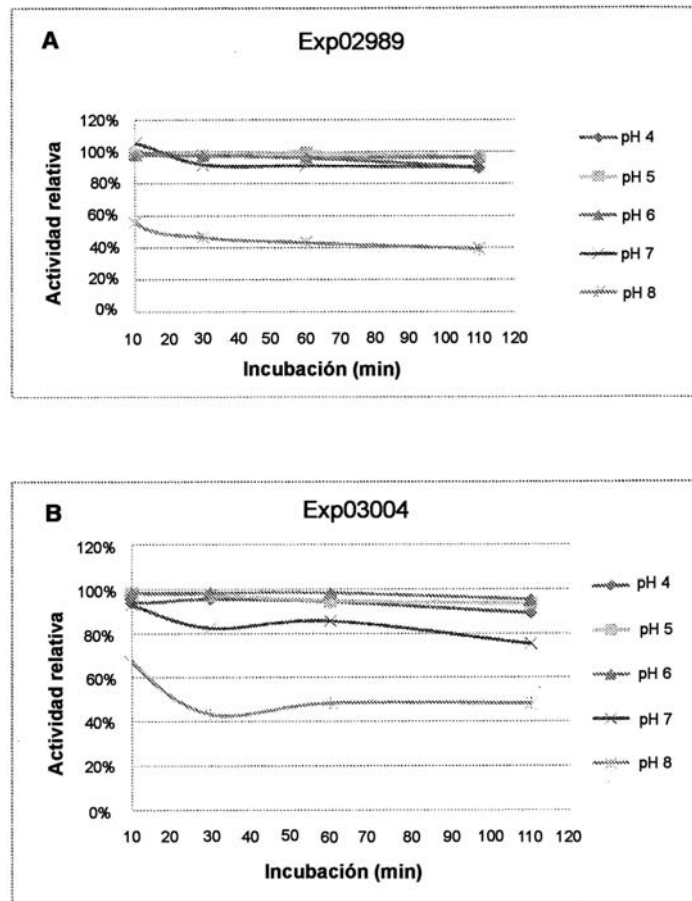


FIG. 8

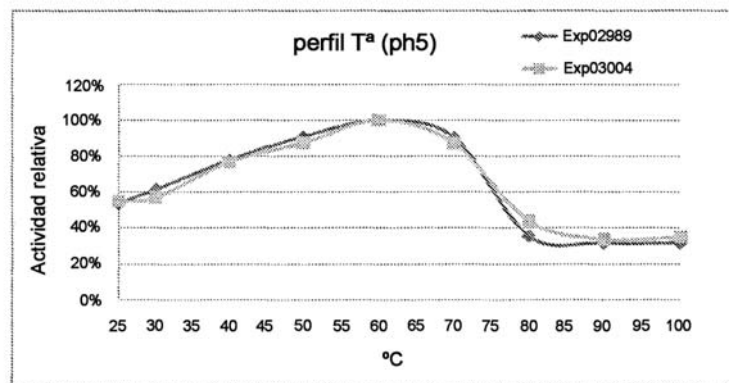


FIG. 9

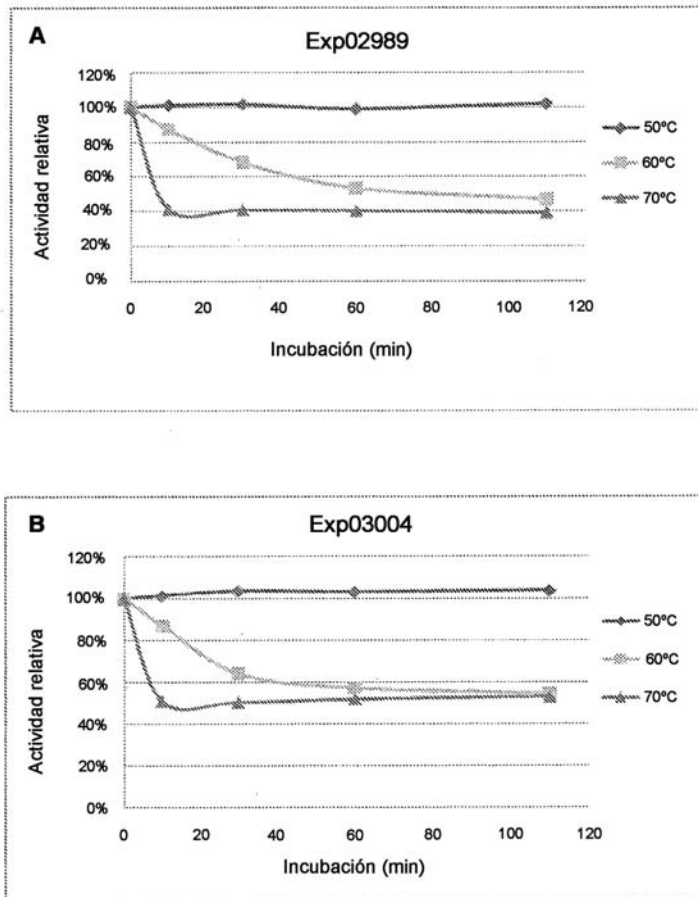


FIG. 10