

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 196**

21 Número de solicitud: 201730113

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

01.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.09.2018

Fecha de concesión:

23.07.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.07.2019

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070023

73 Titular/es:

**ABENGOA BIOENERGÍA NUEVAS
TECNOLOGÍAS, S.A. (100.0%)
C/ Energía Solar, 1 Campus Palmas Altas
41014 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN PÉREZ, Lucía;
DÍEZ GARCÍA, Bruno;
REYES SOSA, Francisco Manuel;
VALBUENA CRESPO, Noelia;
MORENO PÉREZ, Antonio Javier;
PÉREZ GÓMEZ, Dolores;
PLATERO GÓMEZ, Ana Isabel;
GAVALDÁ MARTÍN, Sandra;
VIÑAS DE LA CRUZ, Laura;
ROCHA MARTÍN, Javier;
SÁNCHEZ ZAMORANO, Laura;
BERMÚDEZ ALCÁNTARA, María De Los Angeles;
LEDESMA GARCÍA, Laura y
RAMOS MARTÍN, Juan Luis**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD POLISACÁRIDO MONOOXIGENASA Y SU USO PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES**

ES 2 680 196 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 196**

21 Número de solicitud: 201730113

57 Resumen:

Polipéptidos con actividad polisacárido monooxigenasa y su uso para la producción de azúcares fermentables.

La invención se refiere a polipéptidos con actividad polisacárido monooxigenasa, a una célula hospedadora que los expresa, preferiblemente una célula de *Myceliophthora thermophila* que expresa de manera recombinante al menos uno de dichos polipéptidos, a una composición enzimática que comprende al menos uno de dichos polipéptidos, preferiblemente junto con otras enzimas celulolíticas, al uso de esta célula hospedadora, de al menos uno de los polipéptidos con actividad polisacárido monooxigenasa o de la composición enzimática para la degradación de biomasa celulósica y a un procedimiento para producir bioproductos, preferiblemente bioetanol, que comprende el uso de dicha célula hospedadora, de al menos uno de los polipéptidos de la invención o de la composición enzimática de la invención.

ES 2 680 196 B1

**POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD POLISACÁRIDO MONOOXIGENASA Y SU USO
PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES**

DESCRIPCIÓN

5

La invención se refiere al campo de los bioproductos, más particularmente, a los procesos biotecnológicos de producción de biocombustibles. Concretamente, la invención se refiere a enzimas con actividad polisacárido monooxigenasa y a su uso, formando parte de cócteles enzimáticos, para la producción de azúcares fermentables mediante la hidrólisis de biomasa celulósica durante los procesos de producción de bioproductos tales como bioetanol.

10

TÉCNICA ANTERIOR

15

Los biocombustibles suponen una alternativa atractiva a los combustibles fósiles y se pueden obtener mediante la fermentación de azúcares monoméricos derivados del almidón o la celulosa y hemicelulosa.

20

La biomasa vegetal proporciona una fuente abundante de energía potencial en forma de carbohidratos que pueden utilizarse para numerosos procesos industriales y agrícolas y, por lo tanto, es un recurso importante y renovable para la generación de azúcares fermentables. La fermentación de estos azúcares puede producir productos finales comercialmente valiosos, tales como el etanol también denominado bioetanol.

25

Aunque la fermentación de los azúcares a etanol es relativamente directa, la conversión eficiente de biomasa celulósica en azúcares fermentables, tales como la glucosa, supone un mayor desafío. La enorme energía potencial de los hidratos de carbono que integran la biomasa vegetal no está suficientemente utilizada porque los azúcares forman parte de polímeros complejos (polisacáridos, tales como celulosa y hemicelulosa) y, por tanto, no se encuentran fácilmente accesibles para la fermentación. Así, la celulosa se puede tratar previamente, de forma mecánica, química, enzimática o de otros modos, para aumentar su susceptibilidad a la hidrólisis. Después de este proceso de pretratamiento, tiene lugar una etapa de sacarificación o hidrólisis consistente en un proceso enzimático por el que los hidratos de carbono complejos (como almidón o celulosa) se hidrolizan en sus componentes monosacáridos. El objetivo de cualquier tecnología de sacarificación es, por tanto,

35

alterar o eliminar los impedimentos estructurales y de composición con el fin de mejorar la tasa de hidrólisis enzimática y aumentar los rendimientos de azúcares fermentables obtenidos a partir de celulosa y hemicelulosa (N. Mosier y *col.*, 2005, *Bioresource Technology* 96, 673–686). Después de esta etapa de sacarificación se realiza un proceso de fermentación. Por lo tanto, cuanto mayor es la cantidad de azúcares complejos que permanecen al final del proceso hidrolítico, menor es el rendimiento en la producción de etanol al final del proceso de fermentación. Así, un área de investigación dirigida a disminuir los costes y mejorar el rendimiento de los procesos de producción de biocombustibles está centrada en la mejora de la eficacia técnica de las enzimas hidrolíticas, o en general en la mejora de la eficacia de los cócteles enzimáticos empleados para generar, por hidrólisis, azúcares fermentables a partir de la biomasa.

Se ha demostrado que las enzimas individuales son únicamente capaces de digerir parcialmente la celulosa y la hemicelulosa y, por lo tanto, se requiere la acción combinada de diferentes clases de enzimas para completar su conversión en azúcares monoméricos. Se requieren muchas más enzimas para digerir la hemicelulosa hasta azúcares monoméricos que la celulosa, incluyendo enzimas con actividad xilanasa, beta-xilosidasa, arabinofuranosidasa, mananasa, galactosidasa y glucuronidasa. También pueden estar involucradas otras enzimas sin actividad glicosil hidrolasa, tales como acetil xilano esterasa y ácido ferúlico esterasa. Por ello, la hidrólisis enzimática de los polisacáridos para su conversión en azúcares solubles y, por último, en monómeros tales como xilosa, glucosa y otras pentosas y hexosas, se cataliza mediante varias enzimas que en conjunto se denominan "celulasas". Las celulasas comprenden, al menos, tres actividades principales, endo- β -glucanasa (EC 3.2.1.4), exo- β -glucanasa o celobiohidrolasa (EC 3.2.1.9.1) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), y se ha demostrado que actúan de forma sinérgica en la hidrólisis de la celulosa (Woodward, J. 1991, *Bioresource Technology* Vol 36, pág. 67-75).

Las celulasas microbianas, y en particular las de origen fúngico, se han convertido en biocatalizadores importantes debido a sus extensas aplicaciones industriales (Kuhad R. C. y *col.*, 2011, *Enzyme Research*, Article ID 280696). Hoy en día se viene prestando una considerable atención a la investigación sobre celulasas y los retos en la producción de las mismas, especialmente para la mejora de la economía del proceso para su aplicación industrial, con el fin de obtener celulasas con mayor actividad y mejores propiedades.

Por otro lado, las proteínas glicosil-hidrolasas de la familia 61 (GH61) se conocen desde hace más de 20 años. La primera GH61 descrita, denominada CEL1, fue aislada de *Agaricus bisporus* en 1992 (Raguz y col., 1992, *Gene* 119: 183-190). Estas proteínas GH61 son proteínas accesorias que contribuyen a la degradación de la celulosa. El hecho de que estas enzimas actúen por oxidación directa de la celulosa, en lugar de por su hidrólisis, ha llevado a su denominación actual: monooxigenasas de polisacáridos dependientes de Cu (polisacárido monooxigenasas; PMOs). En comparación con otras enzimas celulolíticas, las PMOs son proteínas relativamente pequeñas con masas moleculares típicamente de entre 20 y 50 kDa (Baldrian y Valaskova 2008, *FEMS Microbiology Reviews* 32: 501-521; Harris y col., 2010, *Biochemistry* 49: 3305-3316). Estas proteínas requieren una molécula de oxígeno para producir la rotura del sustrato por oxidación. Uno de los dos átomos acaba formando una molécula de agua y con el otro se realiza la oxidación directa del sustrato. Por tanto, los miembros de esta familia de enzimas actúan como monooxigenasas de Cu que catalizan la rotura de la celulosa mediante un mecanismo oxidativo, liberando celodextrinas (Langston y col., 2011, *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7007-7015). La acción de las PMOs también se describe en, por ejemplo, Glyn R. Hemsworth, et al., 2014, *Nat Chem Biol.* 10(2): 122–126, en Lucia Zifcakova, Petr Baldrian, 2012, *Fungal ecology* 5: 481-189 y en varios documentos de patente donde se han identificado nuevas PMOs en hongos filamentosos, como en P201430155.

La eficiencia hidrolítica de un complejo multi-enzimático en el proceso de sacarificación del material celulósico depende de las propiedades de las enzimas individuales presentes en el complejo. Por tanto, en el contexto de los procesos de producción de biocombustibles, es necesario el diseño de cócteles enzimáticos con actividades individuales mejoradas cuyo empleo durante la etapa de sacarificación o hidrólisis de la biomasa celulósica conduzca a una mejora en el rendimiento de dicha etapa mediante un incremento en la cantidad de azúcares fermentables obtenidos. Estos azúcares podrán ser posteriormente fermentados para producir biocombustibles, tales como bioetanol, por lo que el empleo de estos cócteles enzimáticos mejorados incrementaría en último término la eficiencia y la rentabilidad de todo el proceso de producción de biocombustibles.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona polipéptidos con actividad polisacárido monooxigenasa (PMO, también conocidos como glicosil-hidrolasas de la familia 61 o GH61) los cuales han sido identificados, aislados y caracterizados a partir de distintos microorganismos. Como muestran los ejemplos de la presente invención, estos polipéptidos presentan la ventaja de que son capaces de incrementar el rendimiento de sacarificación de biomasa celulósica, mediante un aumento en la cantidad de azúcares fermentables (principalmente glucosa) producidos al final de dicho proceso hidrolítico, cuando son añadidos a los cócteles enzimáticos normalmente empleados en los procesos de producción de biocombustibles.

10

Dichos polipéptidos son enzimas monooxigenasas de polisacáridos que intervienen en las fases iniciales del proceso de descomposición de biomasa celulósica hasta azúcares fermentables, siendo estas enzimas las responsables de mejorar la accesibilidad del resto de la maquinaria enzimática al sustrato. De esta forma, aumentan el rendimiento del proceso de hidrólisis incrementando la cantidad de azúcares simples obtenidos (fundamentalmente, glucosa) y con ello, en último término, el rendimiento de la producción de etanol a partir de biomasa.

15

Concretamente, los inventores de la presente invención han identificado, en el genoma de distintos hongos, 22 genes que codifican enzimas con actividad PMO. Las secuencias de aminoácidos de estas 22 enzimas maduras se muestran en las SEQ ID NO: 49 a SEQ ID NO: 70. Estos polipéptidos han sido aislados a partir de *Byssochlamys spectabilis*, *Penicillium oxalicum* 114-2, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus niger* CBS 513.88, *Aspergillus niger* ATCC 1015, *Aspergillus ruber* CBS135680, *Aspergillus terreus* NIH2624, *Neosartorya fischeri* NRRL181, *Aspergillus kawachii* IFO 4308, *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus oryzae* RIB40, *Baudoinia compniacensis* UAMH 10762, *Penicillium roqueforti* FM164, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium crysogenum* Wisconsin, *Penicillium expansum* y *Penicillium rubens* Wisconsin. Estos polipéptidos han sido caracterizados y expresados recombinantemente en una célula hospedadora, preferiblemente en la cepa C1 de *Myceliophthora thermophila*, la cual los secreta al medio extracelular junto con una mezcla enzimática comprendiendo las principales enzimas celulolíticas. Así, se ha evaluado el efecto de estas PMOs de la invención sobre el rendimiento de estos cócteles enzimáticos celulolíticos en la sacarificación de biomasa celulósica, preferiblemente pretratada y más preferiblemente sobre PCS o *pretreated corn stover*. Los resultados han mostrado un

20

25

30

35

aumento en la concentración de azúcares fermentables (principalmente glucosa) liberados en el proceso hidrolítico en comparación con un cóctel enzimático que no comprendía los polipéptidos con actividad PMO de la invención.

5 Así, la presente invención demuestra la mejora en la hidrólisis enzimática de biomasa celulósica con un cóctel celulolítico producido por una célula hospedadora, de preferiblemente *M. thermophila*, modificada para expresar de forma recombinante al menos uno de los polipéptidos con actividad PMO de la invención.

10 La mejora en el rendimiento de las mezclas enzimáticas utilizadas para producir azúcares fermentables a partir de material celulósico en procesos de producción de biocombustibles, preferiblemente etanol, es fundamental para asegurar la rentabilidad de estos procesos. Por ello, es importante encontrar enzimas nuevas y mejoradas capaces de aumentar la eficiencia (rendimiento de producción de azúcares
15 fermentables durante la hidrólisis) de los cócteles enzimáticos en los que se incluyan. La suplementación de un cóctel enzimático comprendiendo enzimas celulolíticas con estas enzimas PMOs proporcionadas por la invención contribuye, por tanto, a mejorar el rendimiento del proceso hidrolítico donde se emplean dichos cócteles, en concreto aumentando el rendimiento de liberación de glucosa desde la biomasa.

20 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido aislado, preferiblemente con actividad polisacárido monooxigenasa, de ahora en adelante “polipéptido de la invención” o “PMO de la invención”, que comprende una secuencia aminoacídica que presenta al menos un 80% de identidad con una
25 secuencia aminoacídica seleccionada de entre la SEQ ID NO: 49 a la SEQ ID NO: 70, preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente con la SEQ ID NO: 65.

30 El polipéptido de la invención puede aislarse de su fuente (microorganismo productor) o entorno (medio extracelular) natural, preferiblemente tras su expresión natural en los hongos que se indican más adelante en esta descripción o a partir de un medio natural o de cultivo donde dichos hongos están presentes, o bien puede ser producido
35 recombinantemente. El polipéptido de la presente invención y sus variantes o derivados pueden ser sintetizados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, *in vitro*. Por

ejemplo, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. El polipéptido de la invención puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión unido a otro péptido o polipéptido el cual puede ser, pero sin limitarnos, heterólogo (de distinto origen al del polipéptido de la invención). Este otro péptido o polipéptido fusionado al polipéptido de la invención puede comprender o consistir en, por ejemplo aunque sin limitarnos, una secuencia señal (péptido señal) u otro polipéptido que tenga por ejemplo una secuencia para facilitar su expresión y/o purificación o un sitio de corte para una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal de la proteína madura.

El polipéptido de la invención puede presentar variantes. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el mantenimiento de la funcionalidad del polipéptido. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones son preferiblemente por aminoácidos conservados. Los aminoácidos conservados son aminoácidos que tienen cadenas laterales y propiedades similares en cuanto a, por ejemplo, hidrofobicidad o aromaticidad. Estas sustituciones incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre lisina (Lys) y arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y/o entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones generadas artificialmente como, por ejemplo, mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales del polipéptido. Por ello, dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homologa a las secuencias descritas en la presente invención.

El término "polisacárido monooxigenasa", "PMO", "Glicosil-hidrolasa de la familia 61" o "GH61" se refiere a una enzima que presenta actividad GH61 o PMO, la cual al ser incluida en una reacción de sacarificación (por ejemplo, aquella en la que se emplean endoglucanasas, beta-glucosidasas y celobiohidrolasas) resulta en una mayor cantidad (mayor rendimiento) de uno o más azúcares solubles (por ejemplo, glucosa) en comparación con la reacción de sacarificación llevada a cabo bajo las mismas

condiciones pero en ausencia de la proteína GH61. La actividad PMO puede determinarse mediante, por ejemplo, ensayos oxidativos indirectos que evidencian coloriméticamente el fenómeno de transferencia de electrones utilizando distintos compuestos donadores y aceptores de electrones (Kitt *et al.*, 2012, *Biotechnology for Biofuels* Vol. 5:79, pág. 1-13). Por otro lado, la actividad PMO sobre biomasa se podría medir, por ejemplo, combinando el polipéptido a testar con enzimas celulasas o celulólicas en una reacción de sacarificación y determinando si existe un incremento en el rendimiento de glucosa comparado con la misma reacción de sacarificación llevada a cabo en presencia de las mismas enzimas y las mismas condiciones pero en ausencia de dicho polipéptido a testar.

En la presente invención las PMOs que comprenden las SEQ ID NO: 49 a la SEQ ID NO: 70 han sido obtenidas a partir de los siguientes hongos:

- 15 - SEQ ID NO: 49, *Byssosclamyces spectabilis*.
- SEQ ID NO: 50, *Penicillium oxalicum* 114-2.
- SEQ ID NO: 51, *Aspergillus clavatus*.
- SEQ ID NO: 52, *Aspergillus fumigatus* Af293.
- SEQ ID NO: 53, *Aspergillus niger* CBS 513.88.
- 20 - SEQ ID NO: 54, *Aspergillus niger* ATCC 1015.
- SEQ ID NO: 55, *Aspergillus ruber* CBS135680.
- SEQ ID NO: 56, *Aspergillus terreus* NIH2624.
- SEQ ID NO: 57, *Neosartorya fischeri* NRRL181.
- SEQ ID NO: 58, *Aspergillus kawachii* IFO 4308.
- 25 - SEQ ID NO: 59, *Aspergillus nidulans* FGSC A4.
- SEQ ID NO: 60, *Aspergillus oryzae* RIB40.
- SEQ ID NO: 61, *Aspergillus oryzae* RIB40.
- SEQ ID NO: 62, *Baudoinia compniacensis* UAMH 10762.
- SEQ ID NO: 63, *Penicillium roqueforti* FM164.
- 30 - SEQ ID NO: 64, *Sclerotinia sclerotiorum*.
- SEQ ID NO: 65, *Penicillium roqueforti* FM164.
- SEQ ID NO: 66, *Penicillium italicum*.
- SEQ ID NO: 67, *Aspergillus flavus*.
- SEQ ID NO: 68, *Penicillium crysogenum* Wisconsin.
- 35 - SEQ ID NO: 69, *Penicillium expansum*.
- SEQ ID NO: 70, *Penicillium rubens* Wisconsin.

En una realización más preferida, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad con una secuencia aminoacídica seleccionada de entre la SEQ ID NO: 49 a la SEQ ID NO: 70, preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente con la SEQ ID NO: 65. En una realización aún más preferida, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 90% de identidad con una secuencia aminoacídica seleccionada de entre la SEQ ID NO: 49 a la SEQ ID NO: 70, preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente con la SEQ ID NO: 65.

El término “identidad”, “homología” o “porcentaje de identidad” se refiere a la relación de residuos de ácidos nucleicos o aminoácidos que son idénticos entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos que se están comparando. Preferiblemente, se entiende por “identidad” la relación de residuos de ácidos nucleicos o aminoácidos que son idénticos entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, con respecto a una longitud de al menos 100 residuos, preferiblemente con respecto a la longitud completa de la secuencia de referencia. Se puede determinar el grado de identidad mediante el método de Clustal, el método de Wilbur-Lipman, el programa GAG, que incluye GAP, BLAST o BLASTN, EMBOSS Needle y FASTA. Además, se puede utilizar el algoritmo de Smith Waterman con el fin de determinar el grado de identidad entre dos secuencias.

Para la comparación de secuencias, típicamente una de las secuencias actúa como secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias “problema”. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias para determinar su identidad, la secuencia de referencia y la/s secuencia/s problema se introducen en el programa, y se configuran los parámetros del mismo. Se pueden usar los parámetros del programa que aparecen por defecto o bien ser configurados, preferiblemente dichos parámetros serán los que aparecen por defecto. Así, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad entre la/s secuencia/s problema y la secuencia de referencia en base a los parámetros del programa. Dos ejemplos de algoritmos que

son útiles para determinar el porcentaje de identidad de secuencia son BLAST y BLAST 2.0, descritos en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-3402 y Altschul *et al.* (1990) *J. Mol Biol* 215(3)-403-410, respectivamente. Preferiblemente, el grado de identidad al que se refiere la presente invención se calcula mediante BLAST.

5 El software para llevar a cabo el análisis BLAST se encuentra disponible públicamente en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

En una realización más preferida, el polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la SEQ ID NO: 49 a la SEQ ID NO: 10 70, preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente comprende la SEQ ID NO: 65.

15 Dentro de los polipéptidos de la invención se incluyen aquellos que pueden comprender un péptido señal unido a su extremo N-terminal. Dicho péptido señal puede ser el que está presente de forma natural en una PMOs u otro procedente de otra proteína (heterólogo). Ejemplos de péptidos señal heterólogos que podrían estar unidos a los polipéptidos PMO de la invención son, aunque sin limitarnos, el péptido 20 señal de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, preferiblemente de secuencia SEQ ID NO: 46, y el péptido señal de la PMO-06230 de *M. thermophila*, preferiblemente de secuencia SEQ ID NO: 48. Más preferiblemente, el péptido señal de SEQ ID NO: 46 está codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 45 y el péptido señal de SEQ ID NO: 48 está codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 47.

25 Cuando el polipéptido de la invención está unido a un péptido señal, dicho polipéptido corresponde a la pre-proteína o polipéptido inmaduro de la enzima PMO madura. Así, se encuentran dentro del alcance de la presente invención tanto los polipéptidos PMOs maduros (donde no existe un péptido señal) como estas pre-proteínas o 30 polipéptidos PMOs inmaduros que comprenden un péptido señal situado en el extremo N-terminal de la secuencia aminoacídica de la enzima madura. Estas pre-proteínas son, preferiblemente, las SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 44. El péptido señal de cada una de estas secuencias SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 44 se muestra en las respectivas secuencias polipeptídicas en el listado de secuencias.

35

En una realización aún más preferida, el polipéptido de la invención consiste en una secuencia aminoacídica seleccionada de entre la SEQ ID NO: 49 a la SEQ ID NO: 70, preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente consiste en la SEQ ID NO: 65. Dichas secuencias corresponden a los polipéptidos maduros de la invención.

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención consiste en una secuencia aminoacídica seleccionada de entre la SEQ ID NO: 23 a la SEQ ID NO: 44, preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 39; más preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 39; aún más preferiblemente consiste en la SEQ ID NO: 39. Dichas secuencias corresponden a los polipéptidos inmaduros de la invención (comprendiendo el péptido señal nativo o presente de forma natural en la enzima).

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención además comprende unido, a su extremo N-terminal, un péptido señal. Preferiblemente dicho péptido señal se selecciona de la lista que consiste en: el péptido señal nativo u originalmente presente en la enzima de forma natural (SPWT, cuya secuencia de aminoácidos se indica en el listado de secuencias en cada polipéptido de la invención de SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 44), el péptido señal de la glucoamilasa A de *A. niger* (SPGA, preferiblemente de SEQ ID NO: 46) o el péptido señal de la PMO-06230 de *M. thermophila* (SPPMO, preferiblemente de SEQ ID NO: 48). En una realización más preferida, el polipéptido de la invención se encuentra unido, por su extremo N-terminal, al péptido señal SPGA, más preferiblemente de SEQ ID NO: 46.

Como se ha explicado anteriormente, el término “pre-proteína” se refiere a un polipéptido que incluye un péptido señal (o secuencia líder) en su extremo amino terminal. Dicho péptido señal es escindido de la pre-proteína por una peptidasa, secretándose así la proteína madura. La porción secretada del polipéptido se denomina “proteína madura” o “proteína secretada”. El “péptido señal” es aquel que dirige al polipéptido dentro de la célula hacia su vía de secreción.

35

Como muestran los ejemplos de la presente invención, los polipéptidos denominados aquí como SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 65 fueron los que mayores incrementos en la capacidad de sacarificación proporcionaron cuando se añadieron como suplemento a mezclas o cócteles enzimáticos producidos por *M. thermophila* (ver figuras 1 y 2). Por ello, en una realización más preferida, el polipéptido de la invención consiste en una secuencia aminoacídica seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente seleccionada de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente consiste en la SEQ ID NO: 65.

De acuerdo a los ejemplos mostrados más adelante, los polipéptidos de la invención proporcionaron incrementos en la capacidad de sacarificación (medida como unidades relativas de glucosa liberada) siguiendo el siguiente orden de mayor a menor:

SEQ ID NO: 65
SEQ ID NO: 59
SEQ ID NO: 52
SEQ ID NO: 60
SEQ ID NO: 53
SEQ ID NO: 55
SEQ ID NO: 51
SEQ ID NO: 58
SEQ ID NO: 64
SEQ ID NO: 54
SEQ ID NO: 56
SEQ ID NO: 66
SEQ ID NO: 68
SEQ ID NO: 69
SEQ ID NO: 70
SEQ ID NO: 49
SEQ ID NO: 61
SEQ ID NO: 62
SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 57
SEQ ID NO: 63
SEQ ID NO: 67

Por ello, la lista anterior muestra el orden de preferencia de los polipéptidos de la invención.

En una realización particular, el polipéptido de la invención comprende una secuencia aminoacídica que presenta al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la SEQ ID NO: 65 y se encuentra unido, por su extremo N-terminal, al péptido señal SPGA, más preferiblemente de SEQ ID NO: 46.

5

El término “incremento” o “aumento” tal y como se emplea en la presente invención se refiere al incremento en el rendimiento de un producto de reacción, por ejemplo, de un azúcar fermentable, preferiblemente glucosa, producido cuando un componente particular presente durante la reacción (tal como un polipéptido PMO de la invención) causa una mayor producción del producto en comparación con una reacción llevada a cabo bajo las mismas condiciones y con el mismo sustrato pero en ausencia del componente en cuestión.

10

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado, de ahora en adelante “polinucleótido de la invención”, que codifica cualquiera de los polipéptidos de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica complementaria al polinucleótido de la invención, o que hibrida bajo condiciones astringentes, preferiblemente bajo condiciones de alta astringencia, con el polinucleótido de la invención.

15

20

Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra. El polinucleótido de la invención puede ser, por tanto, ADN, ARN, o derivados tanto de ADN como de ARN, incluyendo ADNc. El polinucleótido de la invención puede obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencionales, o mediante secuenciación. El polinucleótido, adicionalmente a la secuencia codificante, puede comprender otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, uno o varios intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' y/o 3', sitios de unión a ribosomas, secuencias codificantes para un péptido señal, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente pueden incluir

25

30

35

secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o permitir una mejor purificación del mismo.

5 Las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la invención pueden, por ejemplo, diseñarse en base a las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente invención. Las secuencias nucleotídicas codificantes para los polipéptidos PMO inmaduros descritos en la presente invención (SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 44) consisten, preferiblemente, en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 22. La secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal en cada una de estas PMOs inmaduras se muestra en las respectivas secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 22 del listado de secuencias.

El polinucleótido de la invención puede introducirse en una construcción génica, por ejemplo, en un vector de clonación o vector de expresión, para permitir su replicación o su expresión. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión y purificación del polipéptido de la invención. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una construcción génica que comprende:

- el polinucleótido de la invención que codifica cualquiera de los polipéptidos de la invención, o
- una combinación de dichos polinucleótidos de la invención.

De ahora en adelante se hará referencia a esta construcción génica como “construcción génica de la invención” o “construcción de la invención”.

El término “construcción génica” tal como se usa aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que está aislada y modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no podría existir en la naturaleza. El término “construcción de ácido nucleico” o “construcción génica” es sinónimo del término “casete de expresión” cuando la construcción de ácido nucleico contiene las secuencias control requeridas para la expresión del polinucleótido de la invención. Por tanto, la construcción genética de la invención puede comprender además una o más secuencias control o reguladoras de la expresión génica, tales como, pero sin limitarnos, secuencias promotoras, secuencias líder, secuencias 30 terminadoras de la transcripción, secuencias de poliadenilación, secuencias señal, reguladores, potenciadores, etc.

El término “secuencias control” incluye todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión del polinucleótido de la presente invención en una célula. Cada secuencia control puede ser del mismo o distinto origen que el polinucleótido de la invención. Dichas secuencias control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia potenciadora o reguladora, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia codificante para un péptido señal, y una secuencia terminadora de la transcripción. Como mínimo, las secuencias control incluyen una secuencia del péptido señal, y más preferiblemente también un promotor, y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Se pueden proporcionar también secuencias control con enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias control con la región codificante del polipéptido de la invención. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una secuencia nucleotídica, generalmente “aguas arriba” o “upstream” del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular, promotores ubicuos y promotores inducibles o reprimibles. En general, las secuencias de control dependen del origen de la célula hospedadora en la que va a ser insertada la construcción génica.

En una realización preferida, la construcción génica de la invención es un vector de expresión. Un “vector de expresión” es una molécula de ADN lineal o circular que comprende al menos un polinucleótido de la invención unido de manera operativa a nucleótidos adicionales que se proporcionan para su expresión. Dicho vector que comprende el polinucleótido de la invención se puede introducir en una célula hospedadora de tal manera que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autoreplicante.

El término “unido operativamente” se refiere a una configuración en la que una secuencia control se coloca en una posición adecuada con respecto a la secuencia codificante del polinucleótido de la invención, de tal manera que la secuencia control dirige la expresión de dicho polinucleótido. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de tal manera que ésta se une

operativamente a las secuencias control adecuadas para su expresión. Por tanto, los vectores de expresión a los que se hace referencia en la presente invención comprenden el polinucleótido de la invención, un promotor, y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Los diversos ácidos nucleicos y las secuencias control descritas aquí pueden unirse entre sí para producir un vector de expresión recombinate que puede además incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o la sustitución del polinucleótido que codifica para el polipéptido de la invención en dichos sitios.

El vector de expresión al que se refiere la presente invención puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que se pueda someter de forma conveniente a un procedimiento de ADN recombinante y pueda producir la expresión del polinucleótido de la invención. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el mismo. El vector de expresión puede ser, por ejemplo pero sin limitarnos, un plásmido, un cósmido, un fago, un virus o vector viral, un cromosoma artificial de bacteria (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o similares.

Los vectores pueden ser lineales o circulares cerrados. El vector puede ser un vector replicante de forma 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 cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que contengan conjuntamente el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón.

Los vectores utilizados en la presente invención contienen, preferiblemente, uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de las células transformadas, transfectadas, transducidas, o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona una señal o efecto distinguible, tales como por ejemplo pero sin limitarnos, luminiscencia, resistencia a biocidas o a virus, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares. Los marcadores

seleccionables para uso en una célula hospedadora de hongo filamentoso incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricin acetiltransferasa), *hph* (higromicin fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato decarboxilasa), *pyr5*, *pyr4*, *cysC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), así como sus equivalentes.

Los vectores a los que se refiere la presente invención contienen preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma. Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido de la invención o en cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. De forma alternativa, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en una(s) localización(es) precisa(s) del(los) cromosoma(s).

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender un origen de replicación que le permita replicarse de forma autónoma en la célula hospedadora en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que medie en la replicación autónoma que funcione en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plasmídico" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que permite a un plásmido o vector replicarse *in vivo*. Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula de hongo filamentoso son AMA1 y ANS1.

Se puede insertar un único polinucleótido de la invención o varios polinucleótidos de la invención conjuntamente en la célula hospedadora, mediante la introducción de uno o varios vectores de expresión. Igualmente, se pueden insertar tanto una como más de una copia del mismo polinucleótido de la presente invención en la célula hospedadora para aumentar la producción del/los producto/s génico/s. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora e incluyendo con el polinucleótido un gen marcador seleccionable amplificable, donde las células que contienen las copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente de selección adecuado.

Los procedimientos utilizados para unir los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinante referidos en la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 La construcción génica de la invención se puede introducir en una célula hospedadora competente para llevar a cabo la expresión de uno o más de los polipéptidos de la invención. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende, de manera recombinante (es decir, no natural o por intervención humana), uno o varios de los polinucleótidos de la invención o la construcción génica
- 10 de la invención, de ahora en adelante “célula hospedadora de la invención”. Es decir, la célula hospedadora de la invención ha sido transformada, transfectada, transducida o similares, con al menos un polinucleótido de la invención o con la construcción génica de la invención. Preferiblemente, la célula hospedadora de la invención no es una célula de *Penicillium roqueforti*, más preferiblemente no es una célula de
- 15 *Byssochlamys spectabilis*, *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus terreus*, *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Baudoinia compniacensis*, *Penicillium roqueforti*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium crysogenum*, *Penicillium expansum* o *Penicillium*
- 20 *rubens*. Preferiblemente, la célula hospedadora de la invención comprende, de manera recombinante (es decir, introducidos por intervención humana), uno o varios de los polinucleótidos de la invención seleccionados de la lista que consiste en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 22, preferiblemente uno o varios de los polinucleótidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 17;
- 25 más preferiblemente de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 17; aún más preferiblemente de SEQ ID NO: 17.

En otra realización preferida, el polinucleótido de la invención codifica para un polipéptido de la invención que comprende una secuencia de aminoácidos que

30 presenta al menos un 80% de identidad, más preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 65.

35 En otra realización preferida, la construcción génica de la invención comprende al menos un polinucleótido de la invención que codifica para un polipéptido de la

invención que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80% de identidad, más preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 65.

En otra realización preferida, la célula de la invención comprende al menos un polinucleótido de la invención, o una construcción génica de la invención que lo comprenda, que codifica para un polipéptido de la invención que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80% de identidad, más preferiblemente al menos un 90% de identidad, con la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente con la secuencia SEQ ID NO: 65.

La “célula hospedadora”, tal como se usa aquí, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similares, con el polinucleótido de la invención o con la construcción génica de la invención. La célula hospedadora puede ser eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta u hongo. En una realización preferida, la célula hospedadora es una célula de hongo filamentoso. Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por presentar una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. En una realización más preferida, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*. En una realización más preferida, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus* o *Aspergillus japonicus*. En otra realización más preferida, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium*

sulphureum, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*.

En otra realización más preferida, la célula hospedadora de hongo filamentoso es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*,
 5 *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Gibberella zeae*, *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*,
 10 *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*. En una realización aún más preferida, la célula hospedadora de la invención es cualquier cepa de la especie *Myceliophthora thermophila*. En una realización aún más preferida, la célula hospedadora de la invención es la cepa C1 de *Myceliophthora thermophila*.

15 Se entenderá que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfecto e imperfecto, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, los anamorfos, con respecto al nombre de la especie por el cual son conocidos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes
 20 adecuados. Por ejemplo, *Myceliophthora thermophila* es equivalente a *Chrysosporium lucknowense*.

La célula hospedadora de la invención comprende, por tanto, al menos un polinucleótido de la invención introducido recombinantemente, preferiblemente
 25 mediante la construcción genética de la invención. La expresión “introducido recombinantemente” se refiere a que el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención no se encuentran presentes en dicha célula de manera natural, sino que han sido introducidos intencionadamente por procedimientos de ingeniería genética. Dichos polinucleótidos pueden codificar el polipéptido maduro
 30 o una pre-proteína que consiste en un péptido señal unido a la enzima madura que tendrá que procesarse posteriormente con el fin de producir la enzima PMO madura.

La célula hospedadora de la invención expresa, y preferiblemente también secreta al medio extracelular, al menos uno de los polipéptidos PMO de la invención, o cualquier
 35 combinación de los mismos, de manera que éstos son funcionales. El término “funcional” significa que la/s enzima/s expresada/s retiene/n su capacidad de oxidar la

celulosa, es decir, retienen su actividad polisacárido monooxigenasa. Esta actividad puede medirse por medio de cualquier procedimiento adecuado conocido en el estado de la técnica para evaluar la actividad de PMO.

5 El término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido de la invención como por ejemplo, pero sin limitarse, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación post-traducciona, y secreción.

10 Se puede inducir la expresión del polipéptido de la invención en la célula hospedadora de la invención por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como la transformación de una célula hospedadora adecuada con al menos un polinucleótido de la invención o con la construcción genética de la invención, y el cultivo de la célula hospedadora transformada en condiciones que induzcan la
15 expresión de dicho polinucleótido con el fin de obtener la enzima secretada y funcional.

Se puede cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio nutritivo adecuado, sólido o líquido, para la producción de los polipéptidos PMO de la
20 invención, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz con agitación, y fermentación a pequeña escala o a gran escala (que incluye las fermentaciones continua, discontinua o batch, de alimentación discontinua o fed-batch, o en estado sólido) llevada a cabo en un biorreactor de laboratorio o industrial en un medio adecuado y en condiciones
25 que permitan expresar y/o aislar la PMO. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende, por ejemplo, fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando los procedimientos conocidos en la técnica. Una vez secretada la PMO al medio nutritivo, ésta se puede recuperar directamente del medio.

30 La PMO expresada se puede detectar utilizando procedimientos conocidos en la técnica específicos para polipéptidos. Estos procedimientos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, el seguimiento de la formación de un producto de la enzima, o el seguimiento de la desaparición de un sustrato de la enzima.

35

La PMO resultante se puede recuperar del medio utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la PMO se puede recuperar a partir del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado mediante pulverización, evaporación, o precipitación.

Las PMOs producidas en la presente invención se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatofocalización, y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, focalización isoelectrica preparativa), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación en sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción, con el fin de obtener una PMO sustancialmente pura que se pueda incluir en una composición enzimática junto con otras enzimas celulolíticas.

La célula hospedadora de la invención expresa al menos uno de los polipéptidos de la invención, preferiblemente uno o varios polipéptidos que comprenden o consisten en la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente uno o varios polipéptidos que comprenden o consisten en la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente un polipéptido que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 65, o cualquier combinación de los mismos, o todos. Asimismo, dicha célula puede expresar a su vez una o varias de otras enzimas celulolíticas, nativas o recombinantes.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición enzimática o cóctel enzimático que comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención, denominada a partir de ahora "composición de la invención". Preferiblemente, la composición de la invención comprende uno o varios polipéptidos que comprenden o consisten en un polipéptido seleccionado de la lista que consiste en las SEQ ID NO: 49 a SEQ ID NO: 70, preferiblemente seleccionado de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 o SEQ ID NO: 65; más preferiblemente seleccionado de entre la SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 o SEQ ID NO: 65; aún más preferiblemente el polipéptido de SEQ ID NO: 65.

Se entiende por “composición enzimática” o “cóctel enzimático” una mezcla que comprende al menos dos enzimas capaces de hidrolizar, oxidar, degradar o similares, azúcares.

5 Esta composición de la invención puede comprender además otras actividades enzimáticas, tales como aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, tales como endoglucanasas, beta-glucosidasas y/o celobiohidrolasas; quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, 10 alfa-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, reductasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, proteasa, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasas, o cualquiera de sus combinaciones. La(s) enzima(s) adicional(es) se puede(n) producir recombinantemente o de manera natural, por ejemplo, mediante un microorganismo 15 que pertenece al género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, tal como *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Fusarium reticulatum*, 20 *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*; *Gibberella*, tal como *Gibberella zeae*; *Humicola*, tal como *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; *Trichoderma*, tal como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*; o 25 *Myceliophthora*, tal como *Myceliophthora thermophila*.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende además otra (una o varias) enzima celulolítica. El término “enzimas celulolíticas” también conocido 30 como “celulasas”, se refiere a una clase de enzimas capaces de hidrolizar la celulosa (enlaces de β -1,4-glucano o β -D-glucosídicos) o la hemicelulosa a oligosacáridos más cortos, celobiosa y/o glucosa. Ejemplos de enzimas celulolíticas son, pero no se limitan a, endoglucanasas, beta-glucosidasas, celobiohidrolasas, polisacárido monooxigenasas (otras distintas a las descritas en la presente invención), beta-xilosidasas, endoxiloglucanasas o endoxilanasas. De esta manera, en una realización 35 más preferida, estas enzimas celulolíticas se seleccionan a partir de la lista que

consiste en endoglucanasas, beta-glucosidasas, celobiohidrolasas, celobiosa deshidrogenasas, polisacárido monooxigenasas, beta-xilosidasas, alfa-xilosidasas, endoxilanasas, endoxiloglucanasas, o cualquiera de sus combinaciones. Estas enzimas celulolíticas pueden derivar de la célula hospedadora de la invención o de otros microorganismos productores de enzimas celulolíticas diferentes de la célula hospedadora de la invención, como los indicados anteriormente. Igualmente, se pueden producir de forma natural o recombinante.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende todos los polipéptidos PMO de la invención, más preferiblemente maduros (sin péptidos señal), aún más preferiblemente de secuencias SEQ ID NO: 49 a SEQ ID NO: 70.

Preferiblemente, la composición de la invención comprende al menos un polipéptido de la invención y otras enzimas celulolíticas derivadas de la célula hospedadora de la invención. En una realización aún más preferida, la composición de la invención es una mezcla enzimática expresada (secretada u obtenida) por la célula hospedadora de la invención. En una realización aún más preferida, la composición de la invención es una mezcla enzimática obtenida mediante el cultivo de la célula hospedadora de la invención, más preferiblemente de la cepa *M. thermophila* C1. Esta mezcla enzimática expresada por la célula hospedadora de la invención comprenderá todas o parte de las enzimas celulolíticas producidas de manera natural o recombinante y secretadas por dicha célula. Estas enzimas celulolíticas son, por ejemplo pero sin limitarnos, endoglucanasas, beta-glucosidasas, arabinofuranosidasas, celobiohidrolasas, celobiosas deshidrogenasas, xilosidasas, xilanasas, etc.

El término “endoglucanasa” o “EG” se refiere a un grupo de enzimas celulasas clasificado como E.C. 3.2.1.4. Estas enzimas hidrolizan los enlaces β -1,4 glucosídicos internos de la celulosa.

El término “celobiohidrolasa” se refiere a una proteína que cataliza la hidrólisis de la celulosa a celobiosa mediante una actividad exoglucanasa, liberando secuencialmente moléculas de celobiosa desde los extremos reductores o no reductores de la celulosa o los celooligosacáridos.

El término “beta-glucosidasa”, tal como se usa aquí, se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de un dímero de azúcar, incluyendo, pero sin limitarse a

celobiosa, con la liberación de un monómero de azúcar correspondiente, utilizada, pero sin limitarse, para la síntesis de etanol. La enzima beta-glucosidasa actúa sobre los puentes $\beta 1 \rightarrow 4$ que unen a dos moléculas de glucosa o glucosa sustituida (es decir, el disacárido celobiosa). Es una exocelulasa con especificidad por una variedad de sustratos de beta-D-glucósido. Cataliza la hidrólisis de residuos no reductores terminales en beta-D-glucósidos con liberación de glucosa.

El término "endoxilanasas" se refiere a una enzima que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.

10

El término "beta-xilosidasa" se refiere a una proteína que hidroliza 1,4- β -D-xilooligómeros cortos hasta xilosa.

El término "endoxiloglucanasa" se refiere a una enzima específica de xiloglucano, capaz de catalizar la solubilización de xiloglucano en oligosacáridos pero que no muestra una actividad celulolítica sustancial.

15

El término "celobiosa deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza una reacción química en la que los sustratos son celobiosa y el aceptor y los productos son celobiono-1,5-lactona y el aceptor reducido.

20

El término "alfa-xilosidasa" se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de los residuos de alfa-xilosa no reductores terminales en alfa-xilosidos.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende al menos uno de los polipéptidos de la invención y una mezcla celulolítica que consiste en: endoglucanasa, beta-glucosidasa, celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II. Más preferiblemente, estas enzimas celulolíticas proceden de *M. thermophila*.

25

En una realización más preferida, la composición de la invención además comprende Cu.

30

La composición de la invención se puede preparar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica y puede estar en forma líquida o de una composición seca sólida o semi-sólida. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un

35

granulado o un microgranulado. Las enzimas que se van a incluir en la composición pueden estabilizarse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica.

5 Tal como se ha indicado anteriormente, la célula hospedadora de la invención expresa al menos un polipéptido PMO de la invención, el cual es capaz de oxidar celulosa cuando se secreta al medio extracelular. Esta célula hospedadora es capaz de secretar esta/s enzima/s al medio junto con otra/s enzima/s celololítica/s producida/s de forma natural o recombinante, siendo de esta manera útil para la optimización de la etapa de hidrólisis de la biomasa en azúcares fermentables.

10

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención, del/los polipéptido/s de la invención, o de la composición de la invención, para la degradación o hidrólisis enzimática de biomasa celulósica.

15

El término "biomasa" significa la fracción biodegradable de los productos, residuos y restos de origen biológico procedentes de la agricultura (incluyendo sustancias vegetales, tales como residuos de cultivos, y sustancias animales), industrias forestales (tales como recursos madereros) e industrias relacionadas que incluyen pesquerías y acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y urbanos, tales como residuos sólidos urbanos o residuos de papel. En una realización preferida, la biomasa es paja o la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. En una realización más preferida, la biomasa es biomasa vegetal, más preferiblemente seleccionada de la lista que consiste en: biomasa rica en azúcares fermentables, tales como caña de azúcar; biomasa de almidón, por ejemplo, granos o paja de trigo; o maíz o paja de maíz o grano de maíz o fibra de maíz; o granos o paja de cebada; o granos o paja de sorgo. La biomasa también puede ser, arroz, hierba, ramas, etc. En una realización más preferida, la biomasa celulósica empleada en la presente invención comprende maíz y/o caña de azúcar.

20

25

30

El polipéptido de la invención, así como la célula hospedadora o la composición de la presente invención, se pueden utilizar en la producción de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como materias primas químicas o de la fermentación, a partir de biomasa para la producción de etanol, butanol, plásticos, alcanos, alquenos, u otros productos o intermedios.

35

La célula hospedadora de la presente invención se puede utilizar como una fuente del polipéptido de la invención, y otras enzimas celulolíticas, en un proceso de fermentación con la biomasa.

5 El polisacárido predominante en la pared celular primaria de la biomasa vegetal es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa, y el tercero, dependiendo de la biomasa de que se trate, puede ser pectina. La pared celular secundaria, producida después de que la célula haya detenido su crecimiento, contiene también polisacáridos y está reforzada mediante lignina polimérica covalentemente
10 entrecruzada con hemicelulosa. La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y de esta manera es un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras que la hemicelulosa incluye una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos, y mananos en estructuras ramificadas complejas con una gama de sustituyentes. Aunque generalmente polimorfa, la celulosa se encuentra en el tejido vegetal
15 principalmente como una matriz insoluble cristalina de cadenas paralelas de glucano. Las hemicelulosas se unen normalmente mediante enlaces de hidrógeno a la celulosa, así como a otras hemicelulosas, lo que ayuda a estabilizar la matriz de la pared celular. Los polipéptidos de la invención pueden utilizarse junto con el resto de enzimas celulolíticas para degradar el componente de celulosa del sustrato de la
20 biomasa.

La degradación o hidrólisis de la biomasa a azúcares fermentables, proceso conocido también como “sacarificación”, por medio del polipéptido de la invención, la célula hospedadora de la invención o la composición de la invención, puede ir seguida de un
25 proceso de fermentación en el que los azúcares fermentables obtenidos se utilizan con el fin de obtener finalmente un bioproducto tal como bioetanol.

De esta manera, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de al menos un polipéptido de la invención, de la célula hospedadora de la
30 invención o de la composición de la invención, para la degradación de la biomasa en un proceso de producción de un bioproducto.

El término “bioproducto” o “productos biobasados” se refiere a aquellos materiales, productos químicos y energía derivados de recursos biológicos renovables. Ejemplos
35 de estos bioproductos son, pero no se limitan a, compuestos de hidrocarburo en sus diferentes formas, tales como compuestos alifáticos (saturados, insaturados, cíclicos)

o aromáticos, como alcanos, alquenos, alquinos, formas cíclicas de estos compuestos o hidrocarburos aromáticos; sustancias oxigenadas como alcoholes (tales como etanol, butanol, sorbitol), éteres, aldehídos, cetonas o ácidos carboxílicos; sustancias nitrogenadas como aminas, amidas, nitrocompuestos o nitrilos; sustancias halogenadas como haluros; ácidos orgánicos (tales como ácido láctico, ácido acrílico, ácido acético, ácido succínico, ácido glutámico, ácido cítrico o ácido propiónico). El término “bioproductos” incluye también cualquier combinación de los compuestos descritos anteriormente, compuestos derivados adicionalmente de los compuestos descritos anteriormente mediante cualquier tipo de tratamiento físico, químico o biológico, polímeros de los compuestos descritos anteriormente, compuestos descritos anteriormente sustituidos por cualquier grupo o elemento funcional en una o más de sus formas unidas y ramificadas.

Se puede producir etanol mediante la degradación enzimática de la biomasa y la conversión de los sacáridos liberados en etanol. Este tipo de etanol se denomina a menudo bioetanol. Se puede usar como un aditivo de combustible o extensor en mezclas de menos del 1% hasta un 100% (un sustituto del combustible).

En una realización más preferida, el bioproducto es un biocombustible. El término “biocombustible”, tal como se usa aquí, se refiere a un hidrocarburo, o a una de sus mezclas, que se puede utilizar como combustible y se obtiene utilizando la biomasa fermentable como material de partida. Ejemplos de biocombustibles incluyen, pero no se limitan a, etanol o bioetanol, butanol o biobutanol y biodiesel. En una realización más preferida, el biocombustible es bioetanol.

El término “bioetanol” se refiere a un alcohol preparado mediante fermentación, a partir de biomasa fermentable tal como los hidratos de carbono producidos en cultivos de azúcar o de almidón tales como maíz o caña de azúcar.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir azúcares fermentables a partir de biomasa celulósica, denominado aquí “primer procedimiento de la invención”, que comprende las siguientes etapas:

- a) incubar biomasa celulósica, preferiblemente biomasa pretratada, con la composición de la invención, con al menos un polipéptido de la invención o con la célula hospedadora de la invención, y
- b) recuperar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de

la etapa (a).

Frecuentemente se requiere un procedimiento de pretratamiento de la biomasa para aumentar el acceso de las enzimas a sus sustratos y la hidrólisis eficaz consiguiente.

5 El pretratamiento utiliza diversas técnicas, que incluyen, pero no se limitan a tratamiento químico (por ejemplo, explosión de la fibra con amonio o exposición a un solvente), tratamiento físico (por ejemplo, explosión con vapor a elevadas temperaturas), tratamiento mecánico (por ejemplo, trituración o molienda), tratamiento biológico, o cualquiera de sus combinaciones, para alterar la estructura de la biomasa
10 celulósica y volver la celulosa más accesible.

El término “azúcar fermentable” tal como se usa aquí, se refiere a azúcares sencillos (monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos cortos), tales como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa, sacarosa o fructosa, entre otros. Un azúcar
15 fermentable es cualquiera que pueda utilizar o fermentar un microorganismo. Preferiblemente, los azúcares fermentables a los que se refiere la invención comprenden al menos glucosa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un
20 bioproducto a partir de biomasa celulósica, denominado a partir de ahora “segundo procedimiento de la invención”, que comprende las siguientes etapas:

- a) incubar biomasa celulósica, preferiblemente biomasa pretratada, con la composición de la invención, con al menos un polipéptido de la invención o con la célula hospedadora de la invención,
- 25 b) fermentar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la etapa (a) con al menos un microorganismo fermentador, y
- c) recuperar el bioproducto obtenido después de la fermentación de la etapa (b).

30 El término “fermentador o fermentación” tal como se usa aquí, se refiere a un proceso de transformación biológica producido por la actividad de algunos microorganismos en los que los azúcares tales como glucosa, fructosa, y sacarosa se convierten en etanol. Los microorganismos usados de este modo son microorganismos fermentadores que tienen capacidad de fermentación, tales como levaduras de los géneros
35 *Saccharomyces*, *Pichia* o *Kluyveromyces*, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*,

tanto estirpes naturales como modificadas genéticamente para la conversión de pentosas.

El término “recuperación” tal como se usa aquí, se refiere a la recogida de azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la etapa (a) del primer procedimiento de la invención o del bioproducto obtenido después de la fermentación de la etapa (b) del segundo procedimiento de la invención. Se puede realizar la recuperación mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo los mecánicos o los manuales.

10

En algunas realizaciones, el primer y/o segundo procedimiento de la invención comprende, preferiblemente, un proceso de pretratamiento de la biomasa antes de la etapa (a). En general, un proceso de pretratamiento dará como resultado que los componentes del material celulósico sean más accesibles para las etapas posteriores o sean más digeribles por las enzimas tras el tratamiento en ausencia de hidrólisis. El pretratamiento puede ser un pretratamiento químico, físico, mecánico o biológico, o cualquier mezcla de los mismos. Preferiblemente, el pretratamiento de la biomasa al que se refiere la presente invención se realiza mediante explosión de vapor.

15

20

Antes (es decir en la etapa (a)) y/o simultáneamente con la fermentación de la etapa (b) del segundo método de la invención, la biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, se hidroliza para degradar la celulosa y la hemicelulosa en azúcares y/o oligosacáridos. El contenido en sólidos durante la hidrólisis puede estar, pero sin limitación, comprendido entre el 10-30% del peso total, preferiblemente entre el 15-25% del peso total, más preferiblemente entre el 18-22% del peso total. La hidrólisis se realiza como un proceso en el que la biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, se incuba con al menos un polipéptido de la invención, con la célula hospedadora de la invención o con la composición de la invención y forman así la solución de hidrólisis. El tiempo de proceso adecuado, la temperatura y las condiciones de pH pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Preferiblemente, dicha hidrólisis se realiza a una temperatura de entre 25 °C y 60 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, específicamente alrededor de 50 °C. El proceso se realiza preferiblemente a un pH en el intervalo de 4-6, preferiblemente pH 4,5-5,5, especialmente alrededor de pH 5,2. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza en un tiempo comprendido entre 12 y 144 horas, preferiblemente entre 16 y 120 horas, más preferiblemente entre 24 y 96 horas, incluso más preferiblemente entre 32 y 72 horas.

25

30

35

La hidrólisis (etapa (a)) y la fermentación (etapa (b) del segundo método de la invención) pueden realizarse simultáneamente (proceso SSF) o secuencialmente (proceso SHF). De acuerdo con la invención, la biomasa hidrolizada, y preferiblemente pretratada, se fermenta por al menos un microorganismo fermentador capaz de fermentar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, manosa y galactosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en un tiempo comprendido entre 8 y 96 horas, preferiblemente entre 12 y 72, más preferiblemente entre 24 y 48 horas. En otra realización preferida, la fermentación se realiza a una temperatura de entre 20 °C y 40 °C, preferiblemente de 26 °C a 34 °C, en particular alrededor de 32 °C. En otra realización preferida, el pH es de 3 a 6 unidades, preferiblemente de 4 a 5. Se prefiere para la fermentación etanólica una levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que sean resistentes a altos niveles de etanol, hasta, por ejemplo, el 5 o el 7% en vol. de etanol o más, tal como el 10-15% en vol. de etanol.

En una realización preferida del segundo procedimiento de la invención, el bioproducto es biocombustible, más preferiblemente bioetanol.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Análisis de la liberación de glucosa a partir de biomasa pretratada de maíz (PCS) sometida a distintas composiciones enzimáticas celulolíticas obtenidas a partir de una cepa de *M. thermophila* control (C) y de cepas de *M. thermophila* transformadas con los vectores de expresión codificantes para cada una de las proteínas de la invención.

Figura 2. Análisis de la liberación de glucosa a partir de biomasa pretratada de caña de azúcar (PSCS) sometida a distintas composiciones enzimáticas celulolíticas obtenidas a partir de una cepa de *M. thermophila* control (C) y de cepas de *M.*

thermophila transformadas con los vectores de expresión codificantes para cada una de las proteínas de la invención.

Figura 3. Análisis de la liberación de glucosa a partir de biomasa pretratada de maíz (PCS) sometida a distintas composiciones enzimáticas celulolíticas obtenidas a partir de una cepa de *M. thermophila* control (C) y de cepas de *M. thermophila* transformadas con los vectores de expresión generados para codificar para las diferentes combinaciones de péptido señal (SPWT, péptido señal nativo; SPGA, péptido señal de la glucoamilasa A; SPPMO, péptido señal de la PMO-06230) y proteína madura para las proteínas de SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 65 de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Construcción de los vectores de expresión codificantes para las diferentes polisacárido monooxigenasas de la invención unidas a los diferentes péptidos señal, para su expresión en *M. thermophila* C1.

Los genes de diferentes polisacárido monooxigenasas que se citan según la tabla 1, se emplearon para sobreexpresar las enzimas en la célula hospedadora *M. thermophila* C1 y ensayar los rendimientos de hidrólisis con los cócteles enzimáticos resultantes (secretados por las células transformadas).

Los genes se sintetizaron *in vitro* después de una optimización para eliminar los sitios de restricción de las enzimas más comunes sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada. Los genes resultantes y las secuencias deducidas se referencian según la tabla 1.

Empleando la herramienta SignalP (Petersen *et al.*, 2011, Signal IP 4.0, Nature Methods, 8:785-786) se identificaron los péptidos señal de todas las proteínas. Las secuencias de las proteínas maduras se referencian acorde a la tabla 1.

Antes de la síntesis *in vitro*, el péptido señal de la proteína nativa se reemplazó para generar variantes con el péptido señal de la glucoamilasa A de *Aspergillus niger* (glaA, Uniprot:A2QHE1) o con el péptido señal de la Polisacárido monooxigenasa 06230 (Uniprot:G2QCJ3) del propio *M. thermophila*.

La clonación y expresión de cada gen siguió un procedimiento similar al descrito en la patente (PCT/ES2013/070318).

Ejemplo 2. Efecto de l cóctel producido por las cep as transformantes en la liberación de glucosa durante la hidrólisis enzimática de diferentes substratos lignocelulósicos.

La liberación de azúcares fermentables por los cócteles producidos por la cepa parental de *M. thermophila* C1 (control) y por los clones seleccionados resultantes de la transformación con los vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes de las enzimas unidas al péptido señal de la Glucoamilasa A, se comparó mediante hidrólisis enzimática. Como sustrato para ésta se empleó biomasa pretratada de maíz ("Pretreated Corn Stover", o PCS) o biomasa pretratada de caña de azúcar ("Pretreated Sugar Cane Straw" o PSCS). El pretratamiento de la biomasa se realizó mediante explosión de vapor en presencia de ácido diluido (Nguyen *et al.*, 1998, Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72; Alcántara *et al.* 2016, Biotechnology for Biofuels. 9:207), y el análisis composicional de la biomasa resultante se efectuó de acuerdo a los procedimientos descritos por NREL en "Standard Biomass Analytical Procedures" (http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html). Con objeto de su uso en la hidrólisis, la biomasa fue previamente neutralizada ajustándose a un pH de 6,5. Para el proceso de hidrólisis enzimática se usaron frascos ISO de 100 ml con 20 g de la mezcla de reacción al 20% (p/p) de sólidos totales y suplementada con 8 mg proteína por g de glucano del cóctel procedente de las cepas en cuestión. Los frascos con la mezcla se incubaron durante 72 h a 50 °C con una agitación de 150 rpm en un incubador orbital de 25 mm de diámetro (Infors HT). Una vez finalizado el proceso, el contenido de glucosa en las muestras resultantes del hidrolizado (slurry) se analizó mediante HPLC (Agilent Technologies, 1200 Series) usando un detector del índice de refracción (DIR) y una columna Aminex HPX-87 H.

Los resultados obtenidos con PCS se muestran en la Figura 1 y los obtenidos con PSCS en la Figura 2, donde se puede apreciar que todas las enzimas sobreexpresadas con el péptido señal de la glucoamilasa liberan más glucosa que el cóctel producido por la cepa control, siendo las enzimas de SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 y SEQ ID NO: 65 las que mayores rendimientos en la liberación de glucosa proporcionaron.

Ejemplo 3. Efecto de los diferentes péptidos señal en el rendimiento de los cócteles que sobreexpresan las polisacárido monooxigenasas de la invención.

En este ejemplo se compararon los rendimientos de los cócteles obtenidos al sobreexpresar 3 polisacárido monooxigenasas (SEQ ID NOs: 52, 59 y 65) fusionadas a los diferentes péptidos señal de esta invención: su péptido señal nativo u original (SPWT), el de la glucoamilasa A de *A. niger* (SPGA) y el de la PMO-06230 de *M. thermophila* (SPPMO). Como control se empleó el cóctel enzimático obtenido de la cepa parental de *M. thermophila* C1 no transformada.

10

La hidrólisis enzimática y análisis de los resultados se realizaron según se explica en el ejemplo anterior empleando biomasa pretratada de maíz ("Pretreated Corn Stover", o PCS).

15

Los resultados obtenidos, tal y como se muestran en la Figura 3, demuestran que el aumento de la liberación de azúcares también depende del péptido señal empleado (y por tanto del nivel de sobreexpresión obtenido) con cada una de las enzimas ensayadas, aunque todas superaron a su cepa parental. El péptido señal que mayores rendimientos en la liberación de glucosa proporcionó fue SPGA, seguido de SPPMO y por último SPWT.

20

Tabla 1. Identificación de las secuencias de ADN y proteína correspondientes a cada una de las PMOs de la invención.

Ácido nucleico SEQ ID NO	Secuencia proteica de la enzima inmadura SEQ ID NO	Secuencia proteica de la enzima madura SEQ ID NO
1	23	49
2	24	50
3	25	51
4	26	52
5	27	53
6	28	54
7	29	55
8	30	56
9	31	57
10	32	58
11	33	59
12	34	60

13	35	61
14	36	62
15	37	63
16	38	64
17	39	65
18	40	66
19	41	67
20	42	68
21	43	69
22	44	70

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad polisacárido monooxigenasa que comprende una
5 secuencia aminoacídica que presenta al menos un 80% de identidad con la
 secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 65.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de
 aminoácidos que presenta al menos un 90% de identidad con la secuencia
10 aminoacídica SEQ ID NO: 65.
3. Polipéptido según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de aminoácidos
 SEQ ID NO: 65.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además
15 comprende unido a su extremo N-terminal un péptido señal, preferiblemente el
 péptido señal de SEQ ID NO: 46.
5. Polipéptido según la reivindicación 3, que consiste en la secuencia aminoacídica
 SEQ ID NO: 65.
- 20 6. Polipéptido según la reivindicación 3, que consiste en la secuencia aminoacídica
 SEQ ID NO: 39.
7. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las
25 reivindicaciones 1 a 6.
8. Construcción génica que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7.
9. Construcción génica según la reivindicación 8, donde dicha construcción génica es
30 un vector de expresión.
10. Célula hospedadora que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7 o la
 construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9.
- 35 11. Célula hospedadora según la reivindicación 10, donde dicha célula es
 Myceliophthora thermophila C1.

12. Composición enzimática que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 5 13. Composición enzimática según la reivindicación 12, que además comprende otra enzima celulolítica.
- 10 14. Composición enzimática según la reivindicación 13, donde la enzima celulolítica se selecciona de la lista que consiste en: endoglucanasa, beta-glucosidasa, celobiohidrolasa, celobiosa deshidrogenasa, beta-xilosidasa, alfa-xilosidasa, endoxilanasas, endoxiloglucanasa, polisacárido monooxigenasa o cualquier combinación de las mismas.
- 15 15. Composición enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde dicha composición es una mezcla enzimática expresada por la célula según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.
- 20 16. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, de la célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, para la degradación de biomasa celulósica.
- 25 17. Uso según la reivindicación 16, donde la degradación de biomasa celulósica tiene lugar en un proceso de producción de un bioproducto.
18. Uso según la reivindicación 17, donde el bioproducto es un biocombustible.
19. Uso según la reivindicación 18, donde el biocombustible es bioetanol.
- 30 20. Procedimiento para producir azúcares fermentables a partir de biomasa celulósica que comprende las siguientes etapas:
 - a) incubar biomasa celulósica con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, y
 - b) recuperar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la etapa (a).

21.Procedimiento para producir un bioproducto a partir de biomasa celulósica que comprende las siguientes etapas:

- a) incubar biomasa celulósica con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15,
- 5 b) fermentar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la etapa (a) con al menos un microorganismo fermentador, y
- c) recuperar el bioproducto obtenido después de la fermentación de la etapa (b).

10 22.El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, donde el bioproducto es un biocombustible.

23.El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, donde el biocombustible es bioetanol.

15

FIG. 1

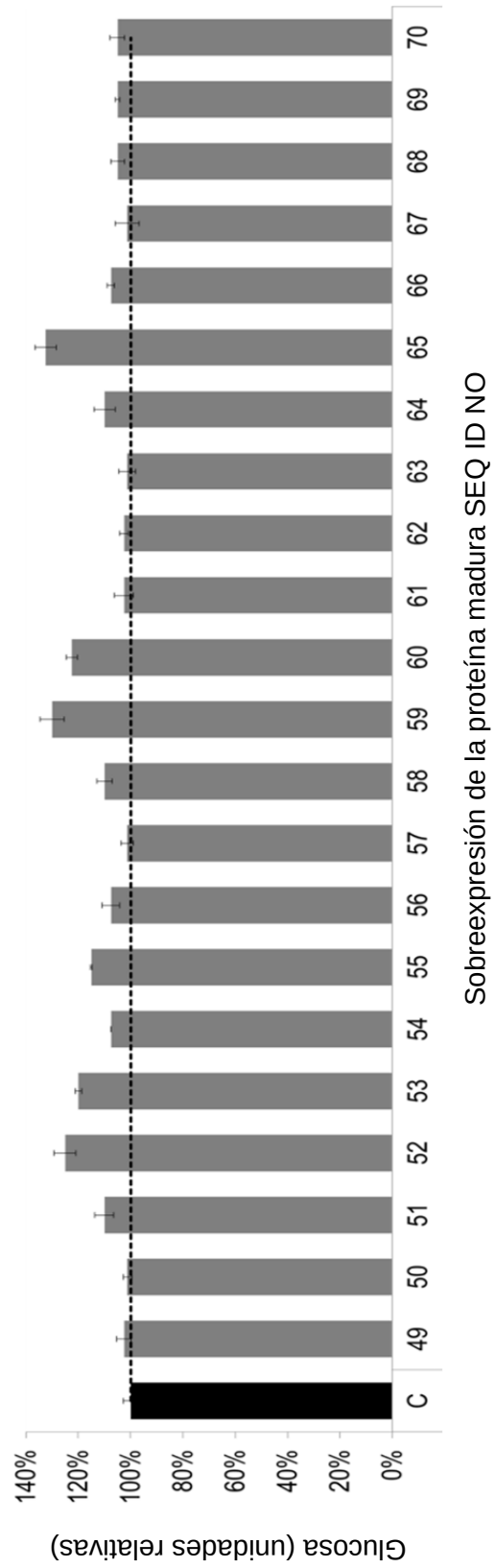


FIG. 2

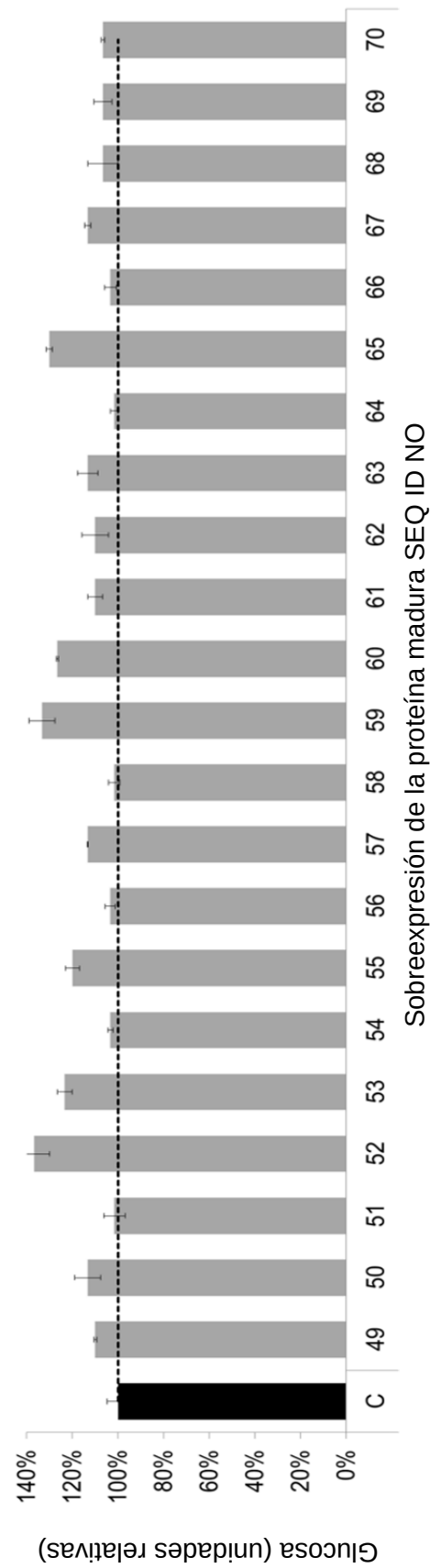


FIG. 3

