



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 371 317**

21 Número de solicitud: 201030913

15 Folleto corregido: A1

Texto afectado: IET

48 Fecha de publicación de la corrección: 06.02.2012

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 15/56** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE CORREGIDA

A9

22 Fecha de presentación: **14.06.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**29.12.2011**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)  
**c/ Serrano, nº 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**BIOPOLIS, S.L.** (Titular al 50 %)

72 Inventor/es: **Mc Cabe, Andrew Peter;**  
**Polaina Molina, Julio;**  
**Sánchez Hervás, Meritxell;**  
**Vallés Alventosa, Salvador;**  
**Manzanares Mir, Paloma;**  
**Martorell Guerola, Patricia;**  
**Ramón Vidal, Daniel y**  
**Genovés Martínez, Salvador**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Endoxilanasas termorresistente obtenida por mutagénesis y su aplicación al proceso de obtención de bioetanol.**

57 Resumen:

Endoxilanasas termorresistente obtenida por mutagénesis y su aplicación al proceso de obtención de bioetanol.

La presente invención describe una secuencia peptídica a la se han sustituido una serie de aminoácidos por mutagénesis dirigida a partir de la secuencia codificante de endoxilanasas de *Aspergillus nidulans* para obtener una endoxilanasas que presenta una mayor estabilidad térmica. Además, la presente invención se refiere al uso de esta endoxilanasas para la obtención de xilano a partir de materia vegetal y al posterior uso de este xilano en procesos de obtención de bioetanol.

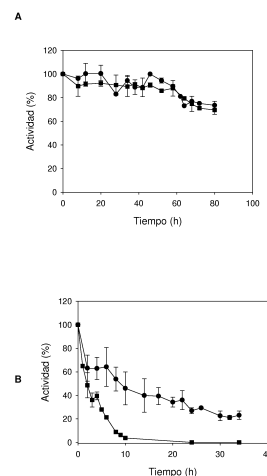


FIG. 1

**DESCRIPCIÓN**

Endoxilanasas termorresistente obtenida por mutagénesis y su aplicación al proceso de obtención de bioetanol.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una endoxilanasas modificada obtenida por mutagénesis dirigida a partir de la secuencia que codifica para la endoxilanasas de *Aspergillus nidulans* y al uso de esta endoxilanasas modificada para obtener xilano que posteriormente se emplea en procedimientos de obtención de bioetanol. Por tanto, la presente invención se engloba en el campo de la biotecnología y más particularmente a la biotecnología industrial.

**Estado de la técnica anterior**

15 Actualmente, el bioetanol es el biocombustible con mayor producción mundial, del que se elaboraron más de 40.000 millones de litros durante el año 2004 en todo el mundo. Para su fabricación se pueden utilizar una gran cantidad de materias primas, principalmente caña de azúcar, almidón de maíz, remolacha, cereal o residuos forestales, incluso se está estudiando la posibilidad de cultivar árboles, con alto contenido de celulosa, como pueden ser el chopo o el sauce, con el único fin de producir etanol.

20 Otra alternativa a las cosechas dedicadas a fines energéticos, es el uso de residuos de procesos agrícolas, forestales o industriales, con alto contenido en biomasa. Estos residuos pueden ir desde la paja de cereal a las "limpias" forestales, pasando por los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) o las cáscaras de cereal o de arroz. Los residuos tienen la ventaja de su bajo coste, ya que son la parte no necesaria de otros productos o procesos, salvo cuando son utilizados en la alimentación del ganado. Los RSU tienen un alto contenido en materia orgánica, como papel o madera, que los hace una potencial fuente de materia prima, aunque debido a su diversa procedencia pueden contener otros materiales cuyo preproceso de separación incrementa mucho el precio de la obtención del bioalcohol.

30 El proceso de degradación de los residuos vegetales se lleva a cabo mediante el empleo de reactores enzimáticos industriales que se alimentan con dichos residuos. La degradación se realiza mediante el uso de complejos enzimáticos comerciales que son una mezcla heterogénea de distintas actividades enzimáticas (fundamentalmente celulasas y hemicelulasas) capaces de degradar la malla de la pared celular vegetal. En estos reactores es posible degradar la pared celular vegetal a sus monosacáridos constituyentes. Tras esta degradación, el medio de reacción se transfiere a un fermentador y se usa como fuente de carbono para el crecimiento de un microorganismo, en casi todos los casos descritos una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que lo aprovecha para producir bioetanol mediante la fermentación alcohólica. Sin embargo, a pesar de la metodología desarrollada, aun existen algunas barreras tecnológicas para el uso a gran escala de estas tecnologías. Una de las más importantes hace referencia a los altos costes de compra de los complejos enzimáticos cuyos componentes presentan baja actividad específica y poca adecuación tecnológica a las condiciones del proceso. La temperatura a la que se llevan a cabo estos procesos es uno de los factores limitantes de la actividad enzimática, por lo que la búsqueda de enzimas termoestables resulta imprescindible.

45 Dentro de las hemicelulasas, las xilanasas son las principales enzimas responsables de la degradación del xilano. La capacidad de producir estas enzimas, que poseen un amplio espectro de acción, está ampliamente distribuida en el mundo microbiano. Su aplicación se ha dirigido principalmente hacia la industria del papel y de la pulpa. Por ello, se han desarrollado diferentes patentes que proponen el uso de xilanasas en estos procesos, que se llevan a cabo en condiciones alcalinas y a temperaturas a las cuales dichas enzimas deben ser termoestables (ES2146756(T3), US5916795 (A), US6083733(A), IN185709(A1), US5736384(A), WO2006104448(A1), WO0068396(A2), US6682923(B1)). Estas xilanasas también juegan un papel importante para aumentar la digestibilidad de piensos animales (US2006193843 (A1), US7060482(B1), WO0029587(A1).

55 El empleo de las xilanasas en los procesos de degradación del material vegetal, previos a la obtención de bioetanol, esta relativamente menos documentado aunque existen diferentes trabajos científicos que demuestran la posibilidad de obtener xilanasas que se adecuen a las condiciones tecnológicas de los mismos (Menon *et al.*, *Bioresource Technology* 2010, 101, 5366-5373; Kapoor *et al.*, *Biochemical Engineering Journal* 2008, 38, 88-97.; Polizeli *et al.*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, 67, 577-591.

**Descripción de la invención**

60 La presente invención describe una enzima endoxilanasas, obtenida por mutagénesis dirigida a partir de la endoxilanasas de *Aspergillus nidulans*, que es más termoestable que la enzima nativa. Esta enzima es útil para degradar materiales lignocelulósicos para obtener azúcares que sirvan como fuente de carbono para levaduras productoras de etanol. La endoxilanasas o endo-1,4-beta-xilanasas es un tipo de enzima que degrada el polisacárido lineal beta-1,4-xilano a oligómeros de xilosa, rompiendo así la hemicelulosa que compone la pared celular de las plantas. *Aspergillus nidulans* es un hongo filamentoso del filum *Ascomycota*.

## ES 2 371 317 A9

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 de *Aspergillus nidulans*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta las sustituciones del aminoácido treonina en la posición 92 y del aminoácido serina en la posición 100 por el aminoácido ácido aspártico y las sustituciones del aminoácido asparagina en la posición 102 y del aminoácido alanina en la posición 195 por el aminoácido arginina, respecto a la secuencia nativa que codifica la endoxilanasas XlnA de *Aspergillus nidulans*.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, donde la secuencia nucleotídica específica es SEQ ID NO: 2.

La secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica cuya transcripción origine un ARN mensajero y su posterior traducción a la secuencia de aminoácidos. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos.

En adelante, para hacer referencia a cualquiera de las secuencias nucleotídicas descritas en los párrafos anteriores, se puede usar la expresión “secuencia nucleotídica de la presente invención” o “secuencia nucleotídica de la invención”.

Otro aspecto de la presente invención es un vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica según se ha descrito anteriormente.

El término “vector de expresión” se refiere a un fragmento de ADN que tiene la capacidad de replicarse en un determinado huésped y, como el término lo indica, puede servir de vehículo para multiplicar otro fragmento de ADN que haya sido fusionado al mismo (inserto). Inserto se refiere a un fragmento de ADN que se fusiona al vector; en el caso de la presente invención, el vector puede comprender la secuencia nucleotídica de la invención que, fusionada al mismo puede replicarse en el huésped adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, cósmidos, bacteriófagos o vectores virales, sin excluir otro tipo de vectores que se correspondan con la definición realizada de vector. Preferiblemente el vector de expresión es capaz de expresarse en un microorganismo tipo bacteria.

Otro aspecto de la presente invención es el producto de expresión de la secuencia nucleotídica de la invención, o del vector de la invención. Preferiblemente, el producto de expresión es la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Esta secuencia da lugar a una endoxilanasas con mayor resistencia térmica respecto a la nativa, una vez realizadas las modificaciones post-traduccionales y después de que la enzima adquiera la conformación en la que es activa.

El término “producto de la expresión” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia se entiende, por ejemplo, el ARN que se obtiene de la transcripción de la secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción del ARN modificada postraduccionalmente o no, o posteriores modificaciones de la secuencia nucleotídica en el interior de la célula siempre que la secuencia resultante tenga su origen en la secuencia original transferida o no pierda la característica funcional que la caracteriza en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es una célula que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, o el vector de la invención o el producto de expresión de la secuencia nucleotídica de la invención, o cualquiera de las combinaciones de secuencia nucleotídica, vector de expresión o producto de expresión. El término “célula” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a una célula procariótica o eucariótica. Así pues, el término célula comprende, al menos, una célula diferenciada o indiferenciada. Asimismo, también se incluye en esta definición un protoplasto (célula de una planta que carece de pared celular).

La célula transformada con un vector que comprende la secuencia nucleotídica de la invención, puede incorporar la secuencia en alguno de los ADN de la célula; nuclear, mitocondrial y/o cloroplástico, o permanecer como parte de un vector que posee su propia maquinaria para autoreplicarse. La selección de la célula que ha incorporado cualquiera de las secuencias de la invención se lleva a cabo por medio de la adición de antibióticos al medio de cultivo o por medio de la no adición al medio de cultivo de algún aminoácido esencial para el metabolismo de dicha célula. En el primer caso, la resistencia de estas células a sustancias como los antibióticos está producida por la síntesis de moléculas codificadas por una secuencia comprendida en la secuencia del vector. En el segundo caso, las células transformadas con el vector de la invención deben ser auxótrofas para un determinado metabolito esencial y el vector de expresión debe comprender al menos una secuencia que permita complementar la falta de dicha auxotrofia.

Un aspecto más de la presente invención es el uso de la secuencia nucleotídica de la invención, del vector de la invención, de la célula de la invención, o del producto de expresión de la secuencia nucleotídica de la invención, para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas. Este producto puede ser obtenido mediante un sistema heterólogo de expresión.

## ES 2 371 317 A9

El término “producto enzimático con actividad endoxilanasas” se refiere a una enzima cuya actividad es identificada con el número EC 3.2.1.8, es decir, dicho número ha sido asignado por la *Enzyme Commission number* de acuerdo a las reacciones químicas que cataliza (*IUBMB Enzyme Nomenclature, CAS Registry Number 9001-42-7*). La enzima capaz de llevar a cabo este tipo de reacción química se denomina endoxilanasas o endo-1,4-beta-xilanasas. Dicha enzima es capaz de hidrolizar el xilano a oligómeros de xilosa.

Otro aspecto de la invención es un método para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas que comprende:

- a) insertar al menos una secuencia nucleotídica según se ha descrito anteriormente en un vector de expresión capaz de expresar dicha secuencia nucleotídica en un microorganismo,
- b) transformar al menos una célula de dicho microorganismo con el producto obtenido en el paso (a), y
- c) cultivar la célula obtenida en el paso (b) en un medio de cultivo.

La transformación a la que se hace referencia en el paso (b) del método se lleva a cabo por medio de técnicas que forman parte del conocimiento general común, como por ejemplo, transformación genética mediada por electroporación, mediante acetato de litio, etc. Mediante estas técnicas se puede conseguir introducir, de forma estable, un vector que incluye cualquiera de las secuencias de la invención, de forma que, tras sucesivas divisiones de la célula, la secuencia incorporada sigue expresándose. El medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las células transformadas es conocido por el experto en la materia.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas, donde además comprende el paso (d); recuperar el producto enzimático con actividad endoxilanasas del medio de cultivo y/o de las células del microorganismo. Dicho producto enzimático puede ser excretado por las células al medio de cultivo en el que están creciendo. El producto también puede recuperarse del interior de las células que lo producen mediante cualquier técnica que permita la lisis de dichas células o mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica que permita la salida de dicho producto enzimático de las células.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas, donde la secuencia nucleotídica insertada en el paso (a) es SEQ ID NO: 2.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al producto enzimático con actividad endoxilanasas obtenible por el método anteriormente descrito.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso del producto enzimático según descrito anteriormente para la obtención de oligómeros de xilosa a partir de materia vegetal. Para ello, el producto enzimático anteriormente descrito se mezcla con el material vegetal rico en xilano previamente acondicionado, y se mantiene durante un tiempo entre 20 y 80 horas, a una temperatura entre 30 y 60°C. La utilización de la enzima termoestable reporta las siguientes ventajas:

- 1) aumenta la eficacia del proceso al ser posible trabajar a 50°C.
- 2) reduce la carga de enzima necesaria para llevar a cabo el proceso.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de bioetanol que comprende:

- a) poner en contacto, *in vitro*, el producto enzimático descrito anteriormente con materia vegetal, e
- b) incubar la mezcla descrita en el paso (a) con microorganismos productores de etanol a una temperatura de entre 30 y 60°C.

En una realización preferida, el método además comprende:

- c) recuperar el bioetanol obtenido tras la incubación descrita en el paso (b).

Los microorganismos más adecuados para la obtención de bioetanol se seleccionan, pero sin limitarse, entre las levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*. También son útiles las bacterias *Zymomonas mobilis*.

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.

## ES 2 371 317 A9

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### 5 Descripción de las figuras

Figura 1.- Estabilidad térmica de la endoxilanasas a 37°C (A) y a 50°C (B). Endoxilanasas nativas (■), endoxilanasas modificadas (●).

10

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la endoxilanasas de la presente invención.

15

Las características que la endoxilanasas debe reunir según las condiciones del proceso de sacarificación del material lignocelulósico son las siguientes: ser estable a 50°C durante 34 horas y al menos 72 horas a 37°C. Se partió de una endoxilanasas de *Aspergillus nidulans* (XlnA) con un peso molecular de 22.000 Da, un pH óptimo de 5.5, una temperatura óptima de 60°C y un gran potencial hidrolítico sobre xilano de diferentes orígenes. La enzima es estable a 37°C pero a 50°C pierde su actividad transcurridas 10 h (ver ejemplo 2), por lo que se planteó una mejora de su termoestabilidad.

20

#### Ejemplo 1

25

##### *Obtención de la endoxilanasas con mayor termorresistencia*

Con la finalidad de hacer más termoestable la endoxilanasas XlnA de *Aspergillus nidulans*, se hizo un estudio de modelización de esta enzima. En primer lugar se usó el programa GenThreader para identificar proteínas, cuyas estructuras tridimensionales se conocen, que potencialmente comparten estructuras terciarias con la enzima XlnA. Se observó a través de este análisis, que una xilanasas (xyn 11A) proveniente del hongo termófilo *Chaetomium thermophilum* presentó la mejor alineación estructural con la enzima XlnA. Se usó el programa "Deep View/Swiss PdbViewer" para modelar XlnA empleando la estructura de xyn 11A como referencia. Tras hacer la modelización de esta enzima y comparar las dos, se observó que las principales diferencias entre ellas eran la ausencia de 2 puentes salinos en la superficie de la xilanasas de *Aspergillus nidulans*. Dado que los puentes salinos superficiales pueden contribuir a la estabilidad térmica de la enzima, se decidió introducir estos cambios en la estructura de la xilanasas XlnA. Con este fin se obtuvo un transformante de *E. coli* con la secuencia codificante de XlnA de *Aspergillus nidulans* clonada en el vector comercial de expresión pALEX (un vector que dispone de un sistema de inducción por salicilato y un promotor fuerte). Se abordó una estrategia de mutagénesis dirigida que consistió en realizar una PCR de fusión de tres fragmentos de la secuencia de ADN que codifica XlnA mediante la cual se introdujeron 10 mutaciones para modificar 4 aminoácidos. Estas mutaciones modificaron los residuos T92 y S100 dando lugar a ácido aspártico y los residuos N102 y A195 dando lugar a arginina.

30

35

#### Ejemplo 2

##### *Caracterización bioquímica de la endoxilanasas modificada frente a la nativa*

Los ensayos cuyos resultados se exponen a continuación están relacionados con las características del proceso en que debe emplearse esta endoxilanasas. Concretamente, la enzima debe reunir las siguientes características: ser estable a 50°C durante 34 horas y al menos 72 horas a 37°C. En la Figura 1 se muestra la estabilidad de la enzima a estas dos temperaturas. Los ensayos de actividad se han realizado en una solución tamponada (tampón acetato 50 mM pH 4.5) empleando como sustrato Azo-Xilano (Megazyme) al 2% y midiendo la actividad siguiendo las especificaciones del proveedor. Como puede observarse para 37°C ambas enzimas, la nativa y la modificada, son estables a lo largo de las 80 horas que duró el ensayo. Sin embargo para la temperatura de 50°C sí que se observa una diferencia en cuanto a la estabilidad entre ambas enzimas, concretamente la vida media de la enzima modificada fue de 9 h 45 min. frente a las 2 h 15 min. correspondientes a la enzima nativa.

50

55

#### Ejemplo 3

##### *Aplicación industrial*

Con estos ensayos se pretende conocer la capacidad hidrolítica de la endoxilanasas modificada para degradar el pre-hidrolizado (slurry) resultante del tratamiento de explosión con vapor de la paja de trigo, liberando oligómeros de xilosa susceptibles de ser hidrolizados a xilosa, que puede servir como fuente de carbono para el crecimiento de las levaduras productoras de etanol.

60

## ES 2 371 317 A9

La composición de este pre-hidrolizado, tanto de la fracción soluble como insoluble, se detalla en la Tabla 1.

TABLA 1

*Composición de la fracción soluble e insoluble del slurry obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de paja de trigo (210°C, 2,5 min)*

Compuesto	Reactor 10 l (NRef 9) 210°C 2,5 min.	
	Fracción soluble (g/L)	Fracción insoluble (% sobre muestra seca)
Celulosa	-	59,4 ± 2,7
Hemicelulosa	-	8,6 ± 0,4
Lignina	-	29,1 ± 0,7
Glucosa	0,860	-
Xilosa	4,290	-
Galactosa	0,220	-
Arabinosa	0,700	-
Manosa	0,090	-
Furfural	1,520	-
HMF	0,780	-
Benzaldehído	0,110	-
Vainillina	0,076	-
Siringaldehído	0,022	-
Ácido Cumárico	0,039	-
Ácido Ferúlico	0,068	-
pH	3,5	-

El ensayo se llevó a cabo mezclando la enzima modificada a una concentración de 26 U/ml con una solución tamponada (acetato sódico 50 mM pH 5) del pre-hidrolizado como sustrato e incubando a 37 y 50°C. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.

## ES 2 371 317 A9

TABLA 2

*Azúcares reductores liberados tras el tratamiento del slurry con la endoxilanasas modificada (µg equivalentes de xilosa/ml) y su incremento relativo (%) con respecto a los tratamientos sin enzima*

Condiciones de Hidrólisis <sup>a</sup>					
37°C 72 h			50°C 34 h		
1 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
19 µg/ml (64%)	12 µg/ml (62%)	12 µg/ml (61%)	14 µg/ml (47%)	9 µg/ml (45%)	3 µg/ml (20%)

<sup>a</sup>Concentración de enzima: 26 U/ml

<sup>b</sup>Concentración de slurry (%) en tampón acetato 50mM pH 5.

En las condiciones 37°C y 72 horas, con unas concentraciones del pre-hidrolizado de paja de trigo (slurry) de 1, 2.5 y 5%, la endoxilanasas modificada fue capaz de incrementar los equivalentes de xilosa aproximadamente en un 60%, tomando como referencia la cantidad inicial presente en el pre-hidrolizado.

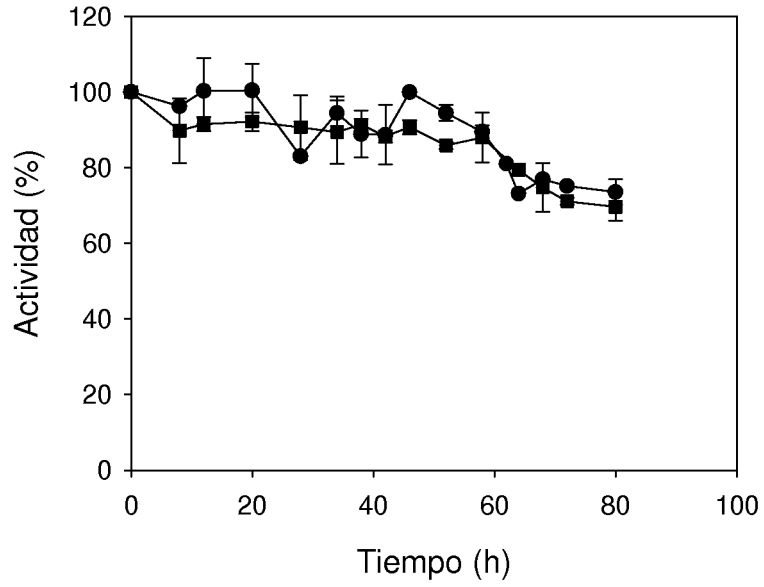
En el caso de 50°C y 34 horas de ensayo, considerando las mismas concentraciones del pre-hidrolizado, el incremento en equivalentes de xilosa fue del orden del 45% para las concentraciones del 1 y 2.5%, mientras que para el 5% este incremento fue del 20%. Cabe destacar que a pesar de que el slurry contiene una serie de compuestos tales como ácido acético, fórmico, cumárico, ferúlico, HMF, catecol, vainillina, siringaldehído y 4-hidroxibenzaldehído que pueden tener carácter inhibitor, la enzima modificada fue capaz de llevar a cabo la hidrólisis.

## ES 2 371 317 A9

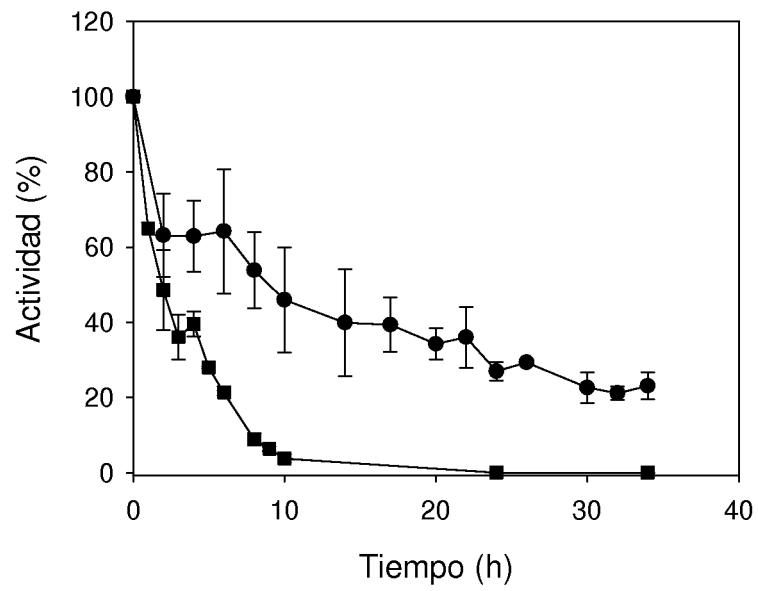
### REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1 de *Aspergillus nidulans*, donde dicha secuencia aminoacídica presenta las sustituciones del aminoácido treonina en la posición 92 y del aminoácido serina en la posición 100 por el aminoácido ácido aspártico y las sustituciones del aminoácido asparagina en la posición 102 y del aminoácido alanina en la posición 195 por el aminoácido arginina.
- 10 2. Secuencia según la reivindicación 1, donde la secuencia nucleotídica es SEQ ID NO: 2.
3. Vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
4. Producto de expresión de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o del vector de expresión según la reivindicación 3.
- 15 5. Producto según la reivindicación 4, donde el producto de expresión es SEQ ID NO: 1.
6. Célula que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, el vector de expresión según la reivindicación 3, el producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, o cualquiera de sus combinaciones.
- 20 7. Uso de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas mediante un sistema heterólogo de expresión.
- 25 8. Uso del vector de expresión según la reivindicación 3, para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas.
9. Uso de la célula según la reivindicación 6, para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas.
- 30 10. Método para la obtención de un producto enzimático con actividad endoxilanasas que comprende:
- a) insertar al menos una secuencia nucleotídica según la reivindicación 1 en un vector de expresión capaz de expresar dicha secuencia nucleotídica en un microorganismo,
- 35 b) transformar al menos una célula de dicho microorganismo con el producto obtenido en el paso (a), y
- c) cultivar la célula obtenida en el paso (b) en un medio de cultivo.
- 40 11. Método según la reivindicación 10, que además comprende:
- d) recuperar el producto enzimático con actividad endoxilanasas del medio de cultivo y/o de las células del microorganismo.
- 45 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la secuencia nucleotídica es SEQ ID NO: 2.
- 50 13. Uso del producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde dicho producto de expresión es una enzima con actividad endoxilanasas, para la obtención de oligómeros de xilosa a partir de materia vegetal.
14. Método para la obtención de bioetanol que comprende:
- 55 a) poner en contacto, *in vitro*, el producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde dicho producto de expresión es una enzima con actividad endoxilanasas, con materia vegetal, e
- b) incubar la mezcla descrita en el paso (a) con microorganismos productores de etanol a una temperatura de entre 30 y 60°C.
- 60 15. Método según la reivindicación 14, que además comprende:
- c) recuperar el bioetanol obtenido tras la incubación descrita en el paso (b).
- 65

**A**



**B**



**FIG. 1**

# ES 2 371 317 A9

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de investigaciones Científicas

5 <120> Endoxilanasas termorresistente obtenida por mutagénesis y su aplicación al proceso de obtención de bioetanol

<130> ES1641.764

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 225

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Sustituciones del aminoácido thr92 y del aminoácido Ser100 por el aminoácido Asp y las sustituciones del aminoácido Asn102 y del aminoácido Ala195 por el aminoácido Arg

25

<400> 1

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

30

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

35

Ser Leu Leu Glu Arg Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Trp Ser Asn Gly  
35 40 45

40

Tyr Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Asp Val Thr Tyr Thr  
50 55 60

45

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

Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Asp Arg Thr Ile Asn  
85 90 95

50

Tyr Gly Gly Asp Phe Arg Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ala Val Tyr  
100 105 110

55

Gly Trp Thr Gln Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr  
115 120 125

60

Gly Thr Tyr Asn Pro Gly Ser Gly Gly Gln His Arg Gly Thr Val Tyr  
130 135 140

Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Tyr Asn Ala  
145 150 155 160

65

Pro Ser Ile Glu Gly Thr Ala Thr Phe Glu Gln Phe Trp Ser Val Arg  
165 170 175

## ES 2 371 317 A9

	Gln	Ser	Lys	Arg 180	Thr	Gly	Gly	Thr	Val 185	Thr	Thr	Ala	Asn	His 190	Phe	Asn
5	Ala	Trp	Arg 195	Ala	Leu	Gly	Met	Arg 200	Leu	Gly	Thr	His	Asn 205	Tyr	Gln	Ile
10	Val	Ala 210	Thr	Glu	Gly	Tyr	Gln 215	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala 220	Ser	Ile	Thr	Val
15		Tyr 225														

<210> 2

<211> 678

20 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia nucleotídica que codifica para SEQ ID NO: 1

<400> 2

30	atgggtctcct tcaaattctct cctagttctc tgttgcgctg cccttggggc attcgctacg	60
	cccgtcgggt ctgaagacct cgccgcacgc gaggcaagcc tgctcgaacg ttctaccctt	120
35	agctccaccg gctggagcaa cggctactac tactccttct ggactgacgg tggcggcgat	180
	gtgacctaca ccaatggtgc cggcggctca tacacagtgc agtggagcaa cgtcggaaac	240
	ttcgttggtg gaaaaggatg gaaccccggg agcgatagaa ccatcaacta cggcggagac	300
40	ttccgcccc a gggcaacgg ctacctgcc gtatacgggt ggacacagaa cccgctgatc	360
	gagtactaca tcgtcgagtc atacggtacg tataatcccg gcagtggcgg ccagcaccgg	420
	ggcaccgtgt actctgatgg cgcaacgtac gacatctaca ccgcgacccg gtacaatgca	480
45	ccgtccatcg aaggcaccgc taccttcgag cagttctggt ctgtccgcca gtcaaagcgg	540
	acgggcggga ctgtgactac ggccaacat ttcaatgctt ggcgcgccct ggggatgagg	600
50	ctgggcaccc ataactatca gattgttgca acggaggggt accagagtag tgggtcggct	660
	tctattactg tttactag	678

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201030913

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 14.06.2010

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2009/0155238 A1 (DAVID WELNER ET AL.) 18.06.2009, párrafos [0754] - [0757]	1-15
A	WO 2009/045627 A2 (VERENIUM CORPORATION) 09.04.2009, página 201 línea 33-página 202 línea 28	1-15
A	WO 2007/094852 A2 (DIVERSA CORPORATION) 23.08.2007, página 214 líneas 8-23	1-15
A	WO 2009/137574 A2 (ARCHER DANIELS MIDLAND COMPANY) 12.11.2009, todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
26.10.2011

Examinador  
M. d. García Coca

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N9/42** (2006.01)

**C12N15/56** (2006.01)

**C12P7/10** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.10.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2009/0155238 A1 (DAVID WELNER et al.)	18.06.2009
D02	WO 2009/045627 A2 (VERENIUM CORPORATION)	09.04.2009
D03	WO 2007/094852 A2 (DIVERSA CORPORATION)	23.08.2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-15, es una endoxilanasas modificada por mutagénesis dirigida a partir de la endoxilanasas de *Aspergillus nidulans* (reiv. 1-9). Es también objeto de la invención el método empleado en su obtención (reiv. 10-12), el uso de la enzima para la obtención de oligómeros de xilosa (reiv. 13) y el uso de dicha enzima en la obtención de bioetanol (reiv. 14-15).

**Novedad y Actividad Inventiva (art. 6.1 y art. 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).**

Los documentos D01, D02 y D03 divulgan enzimas con actividad xilanasas, manasa y/o glucanasas, que presentan una mayor actividad catalítica y estabilidad cuando se aumenta el pH y la temperatura (ver documento D01: abstract; documento D02: página 3 líneas 4-18 y página 12 línea 29-página 13 línea 33; y documento D03: página 6 líneas 1-7 y página 15 líneas 16-29). Estas enzimas son utilizadas, entre otros usos, para la conversión de biomasa en azúcares o polisacáridos fermentables para la producción de alcoholes como el etanol y para la producción de biocombustibles (ver documento D01: párrafos [0011], [0012], [0032], [0033], [0048], [0051] y [0052]; documento D02: página 195 línea 3-página 205 línea 22; y documento D03: página 62 línea 22-página 63 línea 8). En estos documentos también se divulga el método para la obtención de dichas enzimas (ver documento D01: párrafos [0067] y [0068]; documento D02 página 51 línea 18-página 55 línea 27; y documento D03: página 31 línea 3-página 41 línea 23), y un método para la obtención de etanol utilizando las enzimas descritas (ver documento D01: párrafo [0122], documento D02: página 201 línea 33-página 202 línea 28; y documento D03: página 45 línea 15-página 46 línea 7).

Los documentos D01, D02 y D03 divulgan métodos para la obtención de etanol utilizando las enzimas descritas en los propios documentos D01-D03. Uno de los métodos consiste en pretratar la biomasa para romper las fibras vegetales y así obtener una hidrólisis parcial de dicha biomasa. Posteriormente se pone en contacto con las enzimas descritas en los propios documentos D01-D03 y con microorganismos productores de alcohol, para que se de la hidrólisis de la biomasa. Las condiciones para la hidrólisis son: temperatura entre 30 y 60°C y pH entre 4.0 y 8.0. (ver documento D01: párrafos [0754] - [0757]; documento D02: página 201 línea 33-página 202 línea 28; y documento D03: página 214 líneas 8-23).

Aunque todos los documentos citados describen xilanasas modificadas para hacerlas termorresistentes y/o termotolerantes, en ninguno de ellos se describe la endoxilanasas de la invención. Además, aunque el método para la obtención de bioetanol utilizado en la invención, ya es conocido en el estado de la técnica, resulta novedoso la utilización de la enzima de la invención. Por lo tanto, ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-15. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por dichas reivindicaciones. En consecuencia, el objeto de invención según se recoge en las reivindicaciones 1-15, cumple con el requisito de novedad e implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.