

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 561**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2017 PCT/EP2017/065044**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017 WO17220550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2017 E 17732385 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3472336**

54 Título: **Método para producir xilulosa a partir de la xilosa obtenida de biomasa lignocelulósica**

30 Prioridad:

20.06.2016 EP 16175236

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

23.02.2021

73 Titular/es:

**METGEN OY (100.0%)
Rakentajantie 26
20780 Kaarina, FI**

72 Inventor/es:

**BIRIKH, KLARA;
SUONPÄÄ, ANU MINNA MAARET y
HEIKKILÄ, MATTI WILHELM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 807 561 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir xilulosa a partir de la xilosa obtenida de biomasa lignocelulósica

Campo de la invención

5 La invención es en el campo de la enzimología. Más en particular, proporciona un método para la isomerización de xilosa en xilulosa, en donde la xilosa procede de material lignocelulósico.

Antecedentes de la invención

La xilulosa es una cetopentosa, un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono e incluye un grupo funcional cetona. Tiene la fórmula química $C_5H_{10}O_5$. Por naturaleza, se encuentra en forma de enantiómeros tanto L como D.

10 La xilulosa es un compuesto intermedio importante en la fermentación alcohólica de la xilosa mediante levaduras. Debido a la potencial importancia económica de este procedimiento, se ha prestado mucha atención al mecanismo y a la regulación de la fermentación de la xilosa.

Se han descrito diversos métodos para la producción de xilulosa. Los métodos químicos generalmente proporcionan bajos rendimientos y es difícil evitar la formación de isómeros.

15 La xilosa isomerasa es una enzima que convierte la xilosa en xilulosa en una reacción reversible con un equilibrio alrededor de la relación 1 : 1 de xilosa y xilulosa. La enzima puede obtenerse a partir de muchas diferentes especies de bacterias como *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Microbacterium* y *Bacillus*, y la enzima la comercializan o la han comercializado compañías como Enzyme Bio-systems, Genencor, Gist-Brocades, Solvay Enzyme Inc y Novo Nordisk.

20 Las xilosas isomerasas comerciales de mayor éxito se inmovilizan y, como consecuencia, son muy estables con una semivida extremadamente larga. Comercialmente, estas enzimas se usan en su mayoría para convertir la glucosa en fructosa (una actividad que presentan muchas xilosas isomerasas) para obtener el denominado jarabe de maíz con alto contenido de fructosa. En un procedimiento típico, la isomerasa inmovilizada se carga en una columna y se hace pasar el sustrato (materia prima) a su través a una velocidad que produce un efluente que contiene fructosa al 42 %. Es un prerrequisito, sin embargo, que la materia prima sea un hidrolizado refinado que contenga del 93 % al 96 % de glucosa. Se requiere un refinamiento eficaz para retirar impurezas que, de otro modo, producirían la inactivación de la glucosa isomerasa.

25 En el nuevo campo de los biocombustibles de segunda generación y de materiales biorrenovables como los plásticos se utiliza biomasa de lignocelulosa como fuente de azúcares. La lignocelulosa ahí se obtiene preferiblemente a partir de materia seca vegetal de plantas o de partes de plantas que no son comestibles, denominada biomasa lignocelulósica. Es la materia prima más abundante disponible en la tierra. Está constituida por polímeros de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa) y un polímero aromático (lignina). Estos polímeros de carbohidratos contienen diferentes monómeros de azúcar (azúcares de cinco y seis carbonos) y están íntimamente ligados a la lignina.

30 El tratamiento de la biomasa lignocelulósica incluye etapas que permiten la liberación de azúcares de formas poliméricas, como pretratamiento de la biomasa e hidrólisis. Esto va seguido, con frecuencia, por fermentación microbiana de los azúcares mencionados. Como la levadura no puede metabolizar la xilosa, pero puede metabolizar la xilulosa, es deseable convertir la xilosa de xilano vegetal hidrolizado en xilulosa.

35 Una forma alternativa de valorización de la biomasa lignocelulósica es convertir los azúcares en bloques de construcción química para la producción de polímeros. Furfural (nombre IUPAC: furan-2-carbaldehído, $C_5H_4O_2$) está recuperando el interés como alternativa de biobase para la producción de una gran variedad de productos químicos incluidos antácidos, fertilizantes, plásticos y pinturas. El furfural puede obtenerse de xilosa por isomerización a xilulosa. La xilosa isomerasa también puede emplearse, por lo tanto, ventajosamente en esta reacción.

40 Aún no hay disponibles enzimas alternativas para la conversión de xilosa procedente de lignocelulosa en xilulosa, pero sería muy deseable que las hubiera. En la Patente Internacional WO 2012/173659 A2 se describe un método para convertir xilosa en xilulosa que comprende las etapas de proporcionar una composición que comprenda agua, xilosa y lignina en forma de hidrolizado lignocelulósico y convertir enzimáticamente la xilosa en xilulosa en presencia de una xilosa isomerasa.

Sumario de la invención

Se ha encontrado que el uso de xilosa isomerasas disponibles en la actualidad en la conversión de xilosa procedente de lignocelulosa en xilulosa se ve dificultado por las impurezas presentes en la xilosa procedente de lignocelulosa. Estas impurezas conducen a una disminución significativa en la estabilidad de la enzima.

50 En la presente memoria se presenta una xilosa isomerasa que permite evitar etapas de purificación costosas y engorrosas en la producción de xilulosa a partir de material de lignocelulosa. La xilosa isomerasa presentada en la

presente memoria es resistente a algunas o a la mayoría de las impurezas, si no a todas, de la xilosa procedente de lignocelulosa.

5 La conversión de xilosa procedente del material de lignocelulosa se beneficiaría enormemente de una enzima xilosa isomerasa que actuara en mezclas de hidrólisis brutas que comprendan varios componentes de material vegetal, como hemicelulosas, celulosa, otros azúcares y lignina.

10 Se identifica una familia de xilosa isomerasas que son particularmente adecuadas para la conversión de xilosa en xilulosa en un procedimiento en donde la xilosa procede de una fuente de lignocelulosa. Si bien las enzimas comerciales y otras xilosas isomerasas conocidas son inestables en soluciones que comprenden xilosa procedente de lignocelulosa y que requieren una purificación exhaustiva del sustrato, se demuestra en la presente memoria que dos diferentes xilosas isomerasas bacterianas procedentes del género *Diktyoglomus* son resistentes frente a la disminución de la estabilidad cuando se usa xilosa procedente de material lignocelulósico o de biomasa como sustrato. Se muestra en la presente memoria que la lignina inhibe o desactiva o desestabiliza las xilosas isomerasas convencionales, si bien las xilosas isomerasas bacterianas procedentes del género *Diktyoglomus* son resistentes frente a esa.

15 De acuerdo con esto, la invención se refiere a un método para convertir xilosa en xilulosa que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una composición que comprenda agua, xilosa y lignina,
- b) convertir enzimáticamente la xilosa en xilulosa en presencia de una xilosa isomerasa,
- c) opcionalmente purificar la xilulosa de la solución,

20 en donde la xilosa isomerasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos en el 90 % idéntica a la secuencia según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Diagrama en que se muestra la estabilidad de 4 xilosa isomerasas diferentes en 3 incubaciones consecutivas en un sustrato de xilosa puro.

25 Figura 2: Diagrama en que se muestra la estabilidad de 4 xilosa isomerasas diferentes en 3 incubaciones consecutivas en un sustrato de xilosa procedente de lignocelulosa.

Figura 3: Gráfica en la que se muestra la actividad residual relativa de 4 xilosa isomerasas diferentes después de 20 horas de incubación con un sustrato que comprende xilosa procedente de lignocelulosa a 80 grados Celsius, como una función del contenido de lignina (A280).

30 Descripción detallada de la invención

En enzimología, una xilosa isomerasa (EC 5.3.1.5) es una enzima que cataliza la interconversión de xilosa y xilulosa. Esta enzima pertenece a la familia de las isomerasas, específicamente las oxidoreductasas intramoleculares que interconvierten aldosas y cetosas. Se ha observado ahora la enzima xilosa isomerasa en casi cien especies de bacterias. Las xilosa-isomerasas también se denominan comúnmente glucosa-isomerasas debido a su uso en la industria para producir fructosa a partir de glucosa. El nombre sistemático de esta clase de enzima es D-xilosa aldosa-cetosa-isomerasa. Otros nombres de uso común incluyen D-xilosa isomerasa, D-xilosa cetoisomerasa y D-xilosa cetol-isomerasa.

40 Las enzimas xilosa isomerasa comercialmente disponibles se han usado con éxito en la producción de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (JMCF), pero no son adecuadas para la isomerización de la xilosa o la glucosa obtenidas de material de lignocelulosa. Dicha xilosa procedente de lignocelulosa se caracteriza por la presencia de lignina y otros azúcares procedentes de hemicelulosa y opcionalmente de celulosa.

45 La lignina es un material orgánico complejo que comprende polímeros fenólicos reticulados. A pesar de su diversidad estructural, presenta un espectro de absorción característico en el rango ultravioleta con un pico a 280 nm, que se usa con frecuencia para cuantificar el contenido de lignina. Convenientemente, los azúcares, como los monosacáridos, los disacáridos, los polisacáridos y las hemicelulosas, no presentan absorción en el rango ultravioleta.

50 Se ha desarrollado una prueba para determinar la inactivación y la estabilidad de las enzimas xilosa isomerasa (XI) y se ha encontrado que las XI comercialmente disponibles se inactivan rápidamente en una solución que contiene xilosa procedente de lignocelulosa en condiciones de reacción de isomerización y que muchas otras XI de origen bacteriano son inestables también. Como ejemplo representativo, los resultados obtenidos con una XI obtenida a partir de *Thermotoga Neapolitana* (SEQ ID NO: 3) y la XI extensamente usada Sweetzyme® de Novozymes se muestran en la presente memoria. La enzima XI de Novozymes procede de *Streptomyces murinus*; se proporciona una secuencia prototipo de una XI de ese organismo en la presente memoria como SEQ ID NO: 7.

Sorprendentemente, se ha encontrado que dos XI diferentes, procedentes de *Dictyoglomus thermophilum* y *Dictyoglomus turgidum* (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente) son estables en soluciones de xilosa procedente de lignocelulosa. Las enzimas XI de *Dictyoglomus* y sus homólogos son excepcionalmente adecuados, por lo tanto, para la conversión de xilosa procedente de lignocelulosa en xilulosa. Estas XI se refieren en la presente memoria además como XI1 y XI2.

Las xilosa isomerasas según la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 son secuencias homólogas con una identidad de secuencias del 98 %. Puede esperarse, por lo tanto, que las XI estrechamente relacionadas, como las XI con una secuencia de aminoácidos que sea al menos en el 90 %, como en el 91 %, en el 92 %, en el 93 %, en el 94 %, en el 95 %, en el 96 % o en el 97 %, idéntica a cualquiera de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 actuará de la misma manera que la XI1 y la XI2 que son ejemplo en la presente memoria. Dichos homólogos cercanos pueden obtenerse a partir de fuentes naturales o por mutagénesis dirigida. El experto en la técnica conocerá materiales y métodos para obtener dichos homólogos cercanos.

Como se usa en la presente memoria, el grado de identidad entre dos o más secuencias de aminoácidos es equivalente a una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias; es decir, el porcentaje de identidad es igual al número de posiciones idénticas dividido por el número total de posiciones alineadas y multiplicado x 100, excluyendo los huecos, que se requiere que se introduzcan para un alineamiento óptimo de las dos secuencias, y salientes. El alineamiento de dos secuencias tiene que realizarse por toda la longitud de los polipéptidos.

La comparación (alineamiento) de secuencias es una tarea rutinaria para el experto y puede llevarse a cabo usando métodos habituales conocidos en la técnica. Por ejemplo, un *software* gratuito usado convencionalmente para este fin es «Align» herramienta en el recurso NCBI [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq eq&LINK_LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq). Otro *software* comercial y abierto como Vector NTI son también adecuados para este fin.

Las enzimas que no conservan su estabilidad en sustratos de xilosa procedente de lignocelulosa (XI3 y Sweetzyme®) presentaron secuencias de aminoácidos que no estaban completamente relacionadas con las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. Una secuencia prototipo de una XI de *Streptomyces murinus* (Sweetzyme®) fue aproximadamente en el 26 % idéntica sobre el 77 % de la longitud de la secuencia si bien la secuencia de XI3 solo puede alinearse con la secuencia de XI1 sobre el 44 % de la longitud de las secuencias y presenta una identidad del 29 % en esa región.

Si bien todas las enzimas ensayadas eran aun completamente activas en una solución comprendiendo xilosa pura (figura 1, ejemplo 4), la incubación de las enzimas con xilosa procedente de lignocelulosa, conteniendo aproximadamente 8 gramos por litro de lignina (A280 de 130) reveló que la XI1 y la XI2 eran superiores por que no eran desactivadas por la presencia de tales concentraciones de lignina (figura 2, ejemplo 6). Por el contrario, se demostró que la enzima comercial y la XI3 conservaban a lo sumo el 25 % de su actividad después de 2 horas de incubación a 80 grados Celsius a pH 8.0 y eran casi completamente inactivas después de 3 horas en estas condiciones (figura 2). Los experimentos repetidos con un contenido comparable de lignina del orden de 5 a 10 gramos por litro proporcionaron los mismos resultados.

En un experimento en donde se determinó la actividad residual de las XI en presencia de concentraciones variables de lignina, se demostró que en la incubación de las XI durante 20 horas a 80 grados Celsius, la XI3 y Sweetzyme® se desactivaron más del 20 % ya a concentraciones de lignina que correspondían a una A280 de 1.0 (0.06 gramos de lignina por litro de sustrato, figura 3, tabla 1).

A una A280 de 100 (sustrato que contenía 6 gramos de lignina por litro) la enzima comercial y la XI3 se desactivaron completamente después de 20 horas a 80 grados Celsius, mientras que la XI1 y la XI2 aún conservaban más del 50 % de su actividad (figura 3, tabla 1). Cuando se usó lignina Kraft comercialmente disponible de madera dura o blanda (solubilizada en tampón MOPS pH 8.0) en vez de hidrolizado, se obtuvieron resultados similares.

Sin desear apoyar ninguna teoría, se especula que la lignina presente en la solución de xilosa procedente de lignocelulosa produce la pérdida de estabilidad de las XI comerciales, así como la XI3 cuando se ensaya en la presente memoria. La xilosa procedente de lignocelulosa también contiene otros azúcares procedentes de hemicelulosa distintos de la xilosa, pero se encontró que estos no inhibían la XI comercial ni la XI3 cuando se ensayó en la presente memoria.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para la interconversión de xilosa y xilulosa en presencia de una xilosa isomerasa, en donde la xilosa procede de biomasa que contiene lignocelulosa, y en donde la xilosa isomerasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos en el 90 % idéntica a la secuencia según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

La expresión «xilosa procedente de material que contiene lignocelulosa» es equivalente a la expresión «xilosa procedente de lignocelulosa». Las dos se usan en la presente memoria para indicar que la xilosa está contenida en una solución que comprende una cantidad residual de lignina, procedente del material lignocelulósico, como la

biomasa de lignocelulosa. Como tal, el término se usa para distinguir la xilosa de xilosa purificada, que no contiene lignina.

5 La XI1 y la XI2 como se describen en la presente memoria y sus homólogos con al menos una identidad de secuencias del 90 % proporcionan resultados ventajosos en comparación con otras XI. En particular, en condiciones en que la solución de sustrato comprende al menos 0.06 gramos por litro de lignina (A280 de 1.0), como 0.3 gramos de lignina por litro (A280 de 5.0) o incluso 0.6 gramos por litro (A280 de 10).

En otros términos, la invención se refiere a un procedimiento para convertir xilosa en xilulosa que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una composición que comprenda agua, xilosa y lignina,
- 10 b) convertir enzimáticamente la xilosa a xilulosa en presencia de una xilosa isomerasa,
- c) opcionalmente purificar la xilulosa de la solución,

en donde la xilosa isomerasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos en el 90 % idéntica a la secuencia según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

15 En una realización preferida, la lignina está presente en la composición en una concentración de al menos 0.06 gramos por litro. Esto corresponde a una absorbancia a 280 nm de al menos 1.0.

La composición que comprende agua, xilosa y lignina puede obtenerse ventajosamente hidrolizando una composición que comprenda lignina, hemicelulosa y opcionalmente celulosa. Dicha hidrólisis se realiza ventajosamente de manera enzimática, por ejemplo, empleando una xilanasas.

20 La composición que comprende lignina, hemicelulosa y opcionalmente celulosa pueden obtenerse ventajosamente a partir de material que contenga lignocelulosa, como biomasa, como madera, pulpa de madera o biomasa pretratada o madera pretratada. Ventajosamente, la etapa de pretratamiento comprende una etapa de explosión de vapor o una etapa de pretratamiento con ácido.

Todas estas etapas son conocidas en la técnica y el experto conoce los límites y las fronteras de los términos usados en la presente memoria.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un polipéptido según las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

Las construcciones de ADN que codifican los polipéptidos según la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 se diseñaron usando frecuencias de codón optimizadas para la expresión en *E. coli* y se sintetizaron comercialmente y se clonaron en un vector plásmido basado en un plásmido pET28a+ habitual. El vector plásmido contenía una secuencia de nucleótidos que codificaba peptidil-prolil isomerasa (PPlasa) de *Enterobacteriaceae* (número de acceso al banco de datos de proteínas WP_000255997.1). Esta secuencia de nucleótidos codifica una etiqueta N-terminal a la proteína expresada. El gen recombinante se expresó en *Escherichia coli* BL21(DE3) con el control del promotor de la T7-ARN-polimerasa. Esto dio como resultado la expresión de una proteína que comprendía las SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Las secuencias de nucleótidos que codifican las xilosa isomerasas según las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 se proporcionan en la presente memoria como SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Ejemplo 2: Expresión heteróloga de polipéptidos con actividad de xilosa isomerasa

40 La producción de proteínas se llevó a cabo en cepa de *E. coli* BL21 (DE3) según el protocolo del fabricante del plásmido disponible en <http://richsingiser.com/4402/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>. La temperatura de incubación para la producción de proteínas fue 30 grados Celsius, que se encontró óptima para el rendimiento máximo de la proteína activa. Se lisaron células suspendiendo las células en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, Tritón X100 al 1 %, CoCl₂ 1 mM) y calentando a 70 grados Celsius durante 30 min. La actividad de la xilosa isomerasa se detectó en la fracción insoluble solo y se pudo recuperar completamente por centrifugación. Así, la xilosa isomerasa recombinante termoestable se expresó en forma insoluble activa permitiendo la reutilización de la enzima en varios lotes de reacción.

45 Ejemplo 3: Prueba de la actividad de la xilosa isomerasa

La actividad de la xilosa isomerasa (tasa de reacción de isomerización) se determinó midiendo el nivel de xilulosa en la mezcla de reacción según el protocolo descrito en Schenk and Bisswanger, A microplate assay for D-xylose/D-glucose isomerase. Enzyme and Microbial Technology (Elsevier Science Inc, NY, 1998), V22, pp. 721-723.

50 Se llevó a cabo la medición en la fase lineal del transcurso de la reacción en donde la acumulación de producto es lineal en el tiempo. Se tomaron alícuotas de diez microlitros de la mezcla de reacción y se pipetearon en una placa de

96 pozos, se añadieron 40 ul de agua dando como resultado una muestra de 50 ul. En algunos casos, se usó mayor dilución de la mezcla de reacción con agua para preparar 50 ul de la muestra diluida para ajustarse al rango dinámico del método. Se añadieron 150 ul de una mezcla 1 : 1 (v/v) recién preparada de solución A (resorcinol al 0.05 % en etanol) y solución B (0.216 g de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 1 l de HCl concentrado). Para desarrollo del color, se incubó la placa a 80 °C durante 40 minutos. Se midió la absorbancia con un lector de microplacas (Thermo) a 630 nM.

Ejemplo 4. Actividad de isomerización de xilosa de polipéptidos que comprenden las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 y xilosa isomerasa comercial Sweetzyme® en solución de xilosa pura

En este experimento, se compararon cuatro xilosa isomerasas:

- (1) XI1 recombinante (SEQ ID NO: 1) producida en *E. coli*,
- (2) XI2 recombinante (SEQ ID NO: 2) producida en *E. coli*,
- (3) XI3 recombinante (SEQ ID NO: 3) producida en *E. coli* y
- (4) Xilosa isomerasa Sweetzyme® (producto comercial de Novozymes).

Se determinó primero la actividad enzimática en una solución de xilosa (xilosa 130 mM, MOPS 10 mM pH 8.0, MgCl_2 1 mM), esto también se refiere en la presente memoria como «solución de xilosa pura» o «sustrato de xilosa puro».

Se dosificó xilosa isomerasa Sweetzyme®, 0.1 unidades de actividad / ml. Se adaptaron las dosis de otras xilosa isomerasas según las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 para conseguir la misma tasa de conversión que con Sweetzyme® en solución de xilosa pura en las mismas condiciones (pH = 8.0, a 80 grados Celsius).

La cantidad de enzima se seleccionó de manera que durante el tiempo de reacción la formación de producto permaneciera lineal. Las proteínas XI1, XI2 y XI3 que correspondían a las SEQ ID NO: 1 - 3, respectivamente, estaban en la forma de suspensión de agregados activos insolubles. Sweetzyme® es una enzima inmovilizada que se presenta como perlas pequeñas.

Para ensayar la estabilidad de las enzimas, se llevaron a cabo tres rondas consecutivas de incubación con solución de xilosa pura como sustrato. En la primera ronda, después de una hora de tiempo de reacción, las enzimas mostraron actividad casi idéntica (figura 1). Las enzimas se recuperaron después por centrifugación y después de la eliminación del sobrenadante se sometieron a una segunda ronda de incubación con el sustrato de xilosa puro.

Para este fin, se añadió sustrato de xilosa puro fresco (xilosa 130 mM, MOPS 10 mM pH 8.0, MgCl_2 1 mM) a los gránulos que contenían las enzimas, se volvieron a suspender los gránulos y se dejó que continuaran las reacciones durante otra hora. Después de eso, se recuperaron de nuevo las enzimas y se llevó a cabo una tercera ronda de incubación con sustrato de xilosa puro de la misma manera. Los sobrenadantes de las tres reacciones con cada enzima se analizaron en cuanto a la concentración de xilulosa para determinar la actividad enzimática.

En la figura 1 se muestran las actividades enzimáticas de las cuatro preparaciones enzimáticas en las tres rondas consecutivas.

Se puede concluir de esto que las cuatro preparaciones enzimáticas permanecen activas a 80 grados Celsius durante al menos 3 horas sin pérdida de actividad y que las cuatro preparaciones enzimáticas pueden recuperarse completamente de las mezclas por centrifugación y reutilizarse.

Ejemplo 5. Preparación de hidrolizado de lignocelulosa

Se sumergieron virutas de madera de abedul en ácido sulfúrico al 2 % con un contenido de materia seca del 20 % y se sometieron a un pretratamiento de explosión de vapor esencialmente como se describe en la Patente Europea EP2623607A1. El material pretratado contenía, así, fracciones solubilizadas de hemicelulosa y lignina y celulosa insoluble y parte de la lignina. Como el xilano está contenido en la fracción de la hemicelulosa, la fracción líquida se separó de los sólidos y los sólidos se lavaron con agua, dando como resultado 25 g/l de xilano y 10 g/l de lignina.

Esta composición se usó para producir xilosa por hidrólisis enzimática de xilano. La hidrólisis se llevó a cabo usando xilanasa (de DuPont) en las condiciones recomendadas por el fabricante. La mezcla resultante contenía 20 g/l de xilosa (130 mM), 1.8 g/l de manosa, aproximadamente 1.7 g/l de otros azúcares y 9 g/l de lignina.

Antes de la reacción de isomerización, se ajustó el pH a 8 con hidróxido de sodio. La solución resultante se refiere en la presente memoria además como «hidrolizado» o «hidrolizado de hemicelulosa» y se usó para la reacción de isomerización.

Ejemplo 6. Actividad de isomerización de la xilosa de polipéptidos que comprenden las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 y xilosa isomerasa comercial Sweetzyme® en hidrolizado de hemicelulosa

En este experimento, se compararon cuatro xilosa isomerasas:

- (1) XI1 recombinante (SEQ ID NO: 1) producida en *E. coli*,
- (2) XI2 recombinante (SEQ ID NO: 2) producida en *E. coli*,
- (3) XI3 recombinante (SEQ ID NO: 3) producida en *E. coli* y

5 (4)) xilosa isomerasa Sweetzyme® (producto comercial de Novozymes) en un montaje idéntico al descrito en el ejemplo 4, solo que esta vez con hidrolizado de hemicelulosa en vez de xilosa pura como sustrato.

10 Para este fin, se llevó el sustrato a MOPS 10 mM pH 8.0, MgCl₂ 1 mM. Esta solución de sustrato contenía la misma concentración de xilosa que la solución de xilosa pura usada en el ejemplo 4. La única diferencia entre el sustrato del ejemplo 4 y el sustrato descrito en este ejemplo es que el hidrolizado de hemicelulosa contenía adicionalmente otros azúcares procedentes de hemicelulosa y lignina.

Se observó que la XI1 y la XI2 eran estables en el sustrato de hemicelulosa durante al menos tres rondas consecutivas, mientras que la XI3 y Sweetzyme® se deterioraban rápidamente de una ronda a otra y eventualmente se volvieron inactivas (figura 2).

Ejemplo 7: Determinación del contenido de lignina del sustrato

15 Se determinó el contenido de lignina del sustrato procedente de lignocelulosa midiendo la absorbancia a 280 nm (A₂₈₀), en donde una A₂₈₀ de 1.0 corresponde a una concentración de lignina de 0.06 gramos por litro.

Ejemplo 8: Estabilidad de la enzima como función del contenido de lignina del sustrato

En este experimento, se comparó la estabilidad de cuatro xilosa isomerasas:

- (1) XI1 recombinante (SEQ ID NO: 1) producida en *E. coli*,
- 20 (2) XI2 recombinante (SEQ ID NO: 2) producida en *E. coli*,
- (3) XI3 recombinante (SEQ ID NO: 3) producida en *E. coli* y
- (4)) xilosa isomerasa Sweetzyme® (producto comercial de Novozymes).

25 Se añadieron cantidades equivalentes de estas 4 enzimas a una solución que comprendía xilosa 130 mM y concentraciones variables de lignina (cuando se mide por absorbancia a 280 nm (A₂₈₀)) y se incubó durante 20 horas a 80 grados Celsius.

30 En detalle: se diluyó hidrolizado de hemicelulosa con una A₂₈₀ de 130 con una solución de xilosa 130 mM para obtener soluciones de sustrato con la misma cantidad de xilosa (130 mM) y concentraciones variables de lignina cuando se mide por absorbancia a 280 nm. Todas las soluciones de sustrato se llevaron a MOPS 10 mM pH 8.0 y MgCl₂ 1 mM. De esta manera, se obtuvieron soluciones de sustrato idénticas con un contenido de lignina variable que correspondía a una A₂₈₀ de 0.1 a 130. Las soluciones de sustrato contenían cantidades equivalentes de actividad de xilosa isomerasa cuando se mide usando xilosa pura, como se describe en el ejemplo 4.

La incubación se llevó a cabo a 80 grados Celsius durante 20 h. Después, la enzima se recuperó y se ensayó en cuanto a actividad residual sobre sustrato de xilosa puro. Las actividades residuales se muestran en la tabla 1 a continuación y en la figura 3 en escala logarítmica.

35 Se encontró que un sustrato que contenía lignina en una cantidad que correspondía a una A₂₈₀ de 1.0 (0.06 gramos de lignina por litro) ya desactivaba a la enzima comercial Sweetzyme ® y la XI3 más del 20 %, si bien las enzimas XI1 y XI2 se mantenían activas al 100 % hasta una concentración que correspondía a una A₂₈₀ de al menos 5 (0.3 gramos de lignina por litro). A un contenido de lignina que correspondía a una A₂₈₀ de 100 (6 gramos por litro) la enzima comercial Sweetzyme ® y la XI3 eran completamente inactivas, si bien la XI1 y la XI2 mantenían aún al menos el 60 % de su actividad.

Tabla 1: Actividad residual relativa de 4 XI diferentes como una función del contenido de lignina del sustrato

A280	Sweetzyme (R)	XI1	XI2	XI3
0.1	100	100	100	100
1	80	100	100	70

ES 2 807 561 T3

A280	Sweetzyme (R)	X11	X12	X13
5	45	100	100	40
10	35	98	97	30
15	25	95	93	18
20	15	90	88	10
50	5	75	72	3
100	0	65	60	0
130	0	60	55	0

Listado de secuencias

- <110> Metgen OY
- 5 <120> MÉTODO PARA PRODUCIR XILULOSA DE XILOSA OBTENIDA A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.
- <130> 345 WO
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 10 < 211> 368
- < 212> PRT
- < 213> *Dictyoglomus thermophilum*
- <400> 1

ES 2 807 561 T3

```

Met Pro Phe Val Asp His Arg Ala Gln Lys Ile Arg Arg Ser Lys Glu
1           5           10           15
Glu Leu Leu Lys His Met Gln Thr Phe Lys Leu Asp Leu Lys Phe Ser
           20           25           30
Val Gly Ile Trp Tyr Phe Thr Pro Gly Gly Gly Arg Phe His Glu Pro
           35           40           45
Tyr Val Glu Gln Lys Ser Ile Pro Glu Arg Ile Glu Met Ala Ala Glu
           50           55           60
Met Ala Lys Phe Gly Val Lys Gly Ile Glu Ala His Tyr Pro Ala Glu
65           70           75           80
Val Asn Glu Glu Asn Leu His Leu Tyr Lys Gln Leu Glu Lys Glu Ala
           85           90           95
Gly Ile Arg Leu Val Ala Val Pro Leu Ser Leu Phe Tyr Asp Lys Ile
           100          105          110
Phe Glu Phe Gly Ser Leu Ser Asn Pro Tyr Glu Lys Tyr Arg Lys Val
           115          120          125
Ala Tyr Glu Arg Leu Val Asn Gly Leu Lys Leu Val Lys Glu Ala Asn
           130          135          140
Ala Asp Ile Cys Ile Ile Trp Pro Gly Ile Asp Gly Tyr Thr Tyr Ser
145           150          155          160
Tyr Gly His Leu Tyr Tyr His Met Trp Asp Thr Phe Glu Glu Leu Val
           165          170          175
Ala Gln Ala Met Asp Glu Val Pro Gly Val Gln Val Ala Ile Glu Pro
           180          185          190
Lys Pro Tyr Glu Pro Ala Pro Asn Asn Ile Tyr Arg Thr Thr Ala Asp
195           200          205
Gly Ile Leu Ala Ala Arg Asp Ile Glu Ala Arg Leu Lys Asn Pro Glu
210           215          220
Asn Leu Lys Leu Leu Gln Glu Gly His Ala Leu Val Gly Leu Asn Pro
225           230          235          240
Glu Val Gly His Val Arg Met Gly Phe Glu Asp Leu Pro Tyr Ala Tyr
           245          250          255
Ala Arg Val Ala Arg Glu Gly Arg Leu Phe His Thr His Trp Asn Ser
           260          265          270
Gln Pro Leu Gly Asn Tyr Asp Gln Asp Leu Asn Ile Gly Val Val Asp
           275          280          285
Trp Asp Ser Thr Glu Ala Leu Leu Tyr Thr Leu Lys Met Val Gly Tyr
290           295          300
Gln Gly Tyr Phe Gly Ile Asp Ile Asn Pro Glu Arg Met Pro Val Ile
305           310          315          320
Lys Ala Ile Glu Ile Asn Thr Lys Val Leu Gln Ile Met Asn Glu Arg
           325          330          335
Ile Glu Arg Leu Pro His Asp Arg Ile Ile Glu Cys Tyr Phe Asp Pro
           340          345          350
Glu Asn His Arg Gly Glu Leu Glu Leu Ile Leu Ala Glu Asn His Lys
355           360          365

```

<210> 2

< 211> 368

< 212> PRT

< 213> *Dictyoglomus turgidum*

5

<400> 2

ES 2 807 561 T3

```

Met Pro Phe Val Asp His Arg Asn Gln Lys Ile Arg Arg Ser Lys Glu
1           5           10           15
Glu Leu Leu Lys His Met Gln Thr Phe Lys Leu Asp Leu Lys Phe Ser
           20           25           30
Val Gly Ile Trp Tyr Phe Thr Pro Gly Gly Gly Arg Phe His Glu Pro
           35           40           45
Tyr Val Glu Gln Lys Gly Ile Pro Glu Arg Ile Glu Met Ala Ala Glu
           50           55           60
Met Ala Lys Tyr Gly Val Lys Gly Ile Glu Ala His Tyr Pro Ala Glu
65           70           75           80
Val Asn Glu Glu Asn Leu His Leu Tyr Lys Gln Leu Glu Lys Glu Thr
           85           90           95
Gly Ile Arg Leu Val Ala Val Pro Leu Ser Leu Phe Tyr Asp Lys Ile
           100          105          110
Phe Glu Phe Gly Ser Leu Ser Asn Pro Tyr Glu Lys Tyr Arg Lys Ile
           115          120          125
Ala Tyr Glu Arg Leu Val Asn Gly Leu Lys Leu Val Lys Glu Ala Asn
           130          135          140
Ala Asp Ile Cys Ile Ile Trp Pro Gly Ile Asp Gly Tyr Thr Tyr Ser
145           150           155           160
Tyr Gly His Leu Tyr Tyr His Met Trp Asp Thr Phe Glu Glu Leu Val
           165           170           175
Ala Gln Ala Met Asp Glu Val Pro Gly Val Gln Val Ala Ile Glu Pro
           180          185          190
Lys Pro Tyr Glu Pro Ala Pro Asn Asn Ile Tyr Arg Thr Thr Ala Asp
           195          200          205
Gly Ile Leu Ala Ala Arg Asp Ile Glu Ala Arg Leu Lys Asn Pro Glu
           210          215          220
Asn Leu Lys Leu Leu Gln Glu Gly His Ala Leu Val Gly Leu Asn Pro
225           230           235           240
Glu Val Gly His Val Arg Met Gly Phe Glu Asp Leu Pro Tyr Ala Tyr
           245           250           255
Ala Arg Val Ala Arg Glu Gly Arg Leu Phe His Thr His Trp Asn Ser
           260          265          270
Gln Pro Leu Gly Asn Tyr Asp Gln Asp Leu Asn Ile Gly Val Val Asp
           275          280          285
Trp Asp Ser Thr Glu Ala Leu Leu Tyr Thr Leu Lys Met Val Gly Tyr
           290          295          300
Gln Gly Tyr Phe Gly Ile Asp Ile Asn Pro Glu Arg Ile Pro Val Val
305           310           315           320
Lys Ala Ile Glu Ile Asn Thr Lys Val Leu Gln Ile Met Asn Glu Arg
           325           330           335
Ile Glu Arg Leu Pro His Asp Arg Ile Ile Glu Cys Tyr Phe Asp Pro
           340          345          350
Glu Asn His Arg Gly Glu Leu Glu Leu Ile Leu Ala Glu Asn His Arg
           355          360          365

```

<210> 3

< 211> 444

< 212> PRT

< 213> *Thermotoga Neapolitana*

5

<400> 3

ES 2 807 561 T3

Met Ala Glu Phe Phe Pro Glu Ile Pro Lys Val Gln Phe Glu Gly Lys
 1 5 10 15
 Glu Ser Thr Asn Pro Leu Ala Phe Lys Phe Tyr Asp Pro Glu Glu Ile
 20 25 30
 Ile Asp Gly Lys Pro Leu Lys Asp His Leu Lys Phe Ser Val Ala Phe
 35 40 45
 Trp His Thr Phe Val Asn Glu Gly Arg Asp Pro Phe Gly Asp Pro Thr
 50 55 60
 Ala Asp Arg Pro Trp Asn Arg Tyr Thr Asp Pro Met Asp Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Ala Arg Val Asp Ala Leu Phe Glu Phe Cys Glu Lys Leu Asn Ile Glu
 85 90 95
 Tyr Phe Cys Phe His Asp Arg Asp Ile Ala Pro Glu Gly Lys Thr Leu
 100 105 110
 Arg Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asp Lys Val Val Glu Arg Ile Lys Glu
 115 120 125
 Arg Met Lys Asp Ser Asn Val Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala Asn Leu
 130 135 140
 Phe Ser His Pro Arg Tyr Met His Gly Ala Ala Thr Thr Cys Ser Ala
 145 150 155 160
 Asp Val Phe Ala Tyr Ala Ala Ala Gln Val Lys Lys Ala Leu Glu Ile
 165 170 175
 Thr Lys Glu Leu Gly Gly Glu Gly Tyr Val Phe Trp Gly Gly Arg Glu
 180 185 190
 Gly Tyr Glu Thr Leu Leu Asn Thr Asp Leu Gly Phe Glu Leu Glu Asn
 195 200 205
 Leu Ala Arg Phe Leu Arg Met Ala Val Asp Tyr Ala Lys Arg Ile Gly
 210 215 220
 Phe Thr Gly Gln Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Lys Glu Pro Thr Lys
 225 230 235 240
 His Gln Tyr Asp Phe Asp Val Ala Thr Ala Tyr Ala Phe Leu Lys Ser
 245 250 255
 His Gly Leu Asp Glu Tyr Phe Lys Phe Asn Ile Glu Ala Asn His Ala
 260 265 270
 Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Gln His Glu Leu Arg Met Ala Arg Ile
 275 280 285
 Leu Gly Lys Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Gln Gly Asp Leu Leu Leu
 290 295 300
 Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Thr Asn Val Tyr Asp Thr Thr Leu
 305 310 315 320
 Ala Met Tyr Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Phe Thr Lys Gly Gly Leu

ES 2 807 561 T3

```

          325              330              335
Asn Phe Asp Ala Lys Val Arg Arg Ala Ser Tyr Lys Val Glu Asp Leu
          340              345              350
Phe Ile Gly His Ile Ala Gly Met Asp Thr Phe Ala Leu Gly Phe Lys
          355              360              365
Val Ala Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Val Leu Asp Lys Phe Ile Glu
          370              375              380
Glu Lys Tyr Arg Ser Phe Arg Glu Gly Ile Gly Arg Asp Ile Val Glu
385              390              395              400
Gly Lys Val Asp Phe Glu Lys Leu Glu Glu Tyr Ile Ile Asp Lys Glu
          405              410              415
Thr Ile Glu Leu Pro Ser Gly Lys Gln Glu Tyr Leu Glu Ser Leu Ile
          420              425              430
Asn Ser Tyr Ile Val Lys Thr Ile Leu Glu Leu Arg
          435              440

```

<210> 4

< 211> 1107

< 212> ADN

5

< 213> *Dictyoglomus thermophilum*

<400> 4

ES 2 807 561 T3

atgccgtttg ttgatcatcg tgcacagaaa attcgtcgca gcaaagaaga actgctgaaa
60
catatgcaga ccttcaaact ggatctgaaa tttagcgtgg gcatctggta ttttacaccg
120
ggtggtggtc gttttcatga accgtatggt gaacagaaaa gcattccgga acgtattgaa
180
atggcagcag aaatggcaaa atttggcgtg aaaggtattg aagcacatta tccggctgaa
240
gtgaatgaag aaaatctgca cctgtataaa cagctggaaa aagaagcagg tattcgtctg
300
gttgcagttc cgctgagcct gttttatgat aaaatctttg aatttggcag cctgagcaac
360
ccgtatgaaa aatatcgtaa agttgcctat gaacgcctgg tgaatggtct gaaactggtt
420
aaagaagcaa acgcogatat ttgcattatt tggcctggta ttgatggcta tacctatagc
480
tatggtcacc tgtattatca catgtgggat acctttgaag aactggttgc acaggcaatg
540
gatgaagttc cgggtgttca ggttgcaatt gaaccgaaac cgtatgaacc ggcaccgaat
600
aacatttato gtaccaccgc agatggattt ctggcagcac gtgatattga agcgcgtctg
660
aaaaatccgg aaaacctgaa actgctgcaa gaaggtcacg cactggttgg tctgaatccg
720
gaagttggtc atgttcgtat gggttttgaa gatctgccgt atgcatatgc ccgtgttgca
780
cgtgaaggtc gtctgtttca taccattgg aatagccagc cgctgggtaa ttatgatcag
840
gatctgaata ttggtgtggt ggattgggat agcaccgaag cactgctgta taccctgaaa
900
atggttggtt atcagggcta ttttggcatc gatatcaatc cggaacgcat gccggttatt
960
aaagccattg aaattaacac caaagtgctg cagattatga acgaacgcat tgaacgtctg
1020
ccgcatgata gtattattga gtgttatttt gaccctgaga atcatcgtgg tgaactggaa
1080
ctgattctgg ccgaaaatca taaataa
1107

<210> 5

< 211> 1107

5

< 212> ADN

< 213> *Dictyoglomus turgidum*

<400> 5

ES 2 807 561 T3

atgccgtttg tggatcatcg taatcagaaa attcgtcgca gcaaagaaga actgctgaaa
60
catatgcaga ccttcaaact ggatctgaaa tttagcgtgg gcatctggta ttttacaccg
120
ggtggtggtc gttttcatga accgtatggt gaacagaaag gtattccgga acgtattgaa
180
atggcagcag aaatggcaaa atatggcggt aaaggtatcg aagcacatta tccggctgaa
240
gtgaatgaag aaaatctgca cctgtataaa cagctggaaa aagaaaccgg tattcgtctg
300
gttgcagttc cgctgagcct gttttatgat aaaatctttg aatttggcag cctgagcaac
360
ccgtatgaaa aatatcgtaa aattgcctat gaacgcctgg tgaatggtct gaaactggtt
420
aaagaagcaa acgccgatat ttgcattatt tggcctggta ttgatggcta tacctatagc
480
tatggtcacc tgtattatca catgtgggat accttgaag aactggttgc acaggcaatg
540
gatgaagttc cgggtgttca ggttgcaatt gaaccgaaac cgtatgaacc ggcaccgaat
600
aacatttato gtaccaccgc agatggtatt ctggcagcac gtgatattga agcacgtctg
660
aaaaatccgg aaaacctgaa actgctgcaa gaaggtcacg cactggttgg tctgaatccg
720
gaagttggtc atgttcgtat gggttttgaa gatctgccgt atgcatatgc ccgtgttgca
780
cgtgaaggtc gtctgtttca taccattgg aatagccagc cgtgggtaa ttatgatcag
840
gatctgaata ttggtgtggt ggattgggat agcaccgaag cactgctgta taccctgaaa
900
atggttggtt atcagggcta ttttggcacc gatattaatc cggaacgcat tccggttgtt
960
aaagccattg aaattaacac caaagtgctg cagattatga acgaacgcat tgaacgtctg
1020
ccgcatgacc gtattattga gtgttatttt gaccctgaga atcatcgtgg tgaactggaa
1080
ctgattctgg ccgaaaatca tcgttaa
1107

<210> 6

< 211> 1335

5

< 212> ADN

< 213> *Thermotoga Neapolitana*

<400> 6

ES 2 807 561 T3

atggcagaat ttttcccgga aattccgaaa gttcagtttg aaggtaaaga aagcaccaat
60
ccgctggcct ttaaattota tgatccggaa gaaatcattg acggcaaacc gctgaaagat
120
catctgaaat ttagcgttgc attttggcac acctttgtga atgaaggctg tgatccgttt
180
ggtgatccga cgcagatcg tccgtggaat cgttataccg atccgatgga taaagcattt
240
gcacgtgttg atgcactggt tgaattttgc gaaaaactga acatcgagta tttctgcttt
300
cacgatcgcg atattgcacc ggaaggtaaa accctgcgtg aaaccaacaa aattctggat
360
aaagtgggga aacgcatcaa agaacgtatg aaagatagca atgttaaact gctgtggggc
420
accgcaaacc tgtttagcca tccgcgttat atgcatgggtg cagcaaccac ctgtagcgca
480
gatgtttttg cctatgcagc agcacagggt aaaaaagcac tggaaatcac caaagaactg
540
ggtggtgaag gttatgtttt ttgggggtgt cgtgaaggct atgaaacact gctgaatacc
600
gatctgggtt ttgaactgga aaatctggca cgttttctgc gtatggcagt tgattatgca
660
aaacgcattg gttttaccgg tcagtttctg attgaaccga aaccgaaaga accgaccaa
720
caccagtatg attttgatgt tgcaaccgcc tatgcctttc tgaaaagtca tggctctggat
780
gagtacttca aatthaacat cgaagcaaat catgcaacce tggcagggtca tacctttcag
840
catgaaactg ccatggcacg cattctgggt aaactgggta gcattgatgc aaatcagggt
900
gatctgctgc tgggttggga tacagatcag tttccgacca atgtttatga taccaccctg
960
gcaatgtatg aagttattaa agcagcgggt tttaccaaaag gtggcctgaa ttttgatgcc
1020
aaagtctgct gtgcaagcta taaagttgag gacctgttta ttggtcatat cgcaggatg
1080
gatacctttg cactgggttt taaagttgcc taaaaactgg ttaaagatgg cgtgctggat
1140
aaattcatcg aagaaaaata tcgcagcttt cgcgaaggta ttggtcgtga tattgttgaa
1200
ggcaaagtgg attttgagaa actggaagag tacatcatcg ataaagaac cattgaaactg
1260
ccgagcggca aacaagaata tctggaaagc ctgattaaca gctacatcgt gaaaaccatt
1320
ctggaactgc gttaa
1335

<210> 7

< 211> 388

< 212> PRT

< 213> *Streptomyces murinus*

5

<400> 7

ES 2 807 561 T3

```

Met Ser Phe Gln Pro Thr Pro Glu Asp Arg Phe Thr Phe Gly Leu Trp
1           5           10           15
Thr Val Gly Trp Gln Gly Arg Asp Pro Phe Gly Asp Ala Thr Arg Pro
          20           25           30
Ala Leu Asp Pro Val Glu Thr Val Gln Arg Leu Ala Glu Leu Gly Ala
          35           40           45
Tyr Gly Val Thr Phe His Asp Asp Asp Leu Ile Pro Phe Gly Ser Ser
          50           55           60
Asp Thr Glu Arg Glu Ser His Ile Lys Arg Phe Arg Gln Ala Leu Asp
65           70           75           80
Ala Thr Gly Met Thr Val Pro Met Ala Thr Thr Asn Leu Phe Thr His
          85           90           95
Pro Val Phe Lys Asp Gly Gly Phe Thr Ala Asn Asp Arg Asp Val Arg
          100          105          110
Arg Tyr Ala Leu Arg Lys Thr Ile Gly Asn Ile Asp Leu Ala Ala Glu
          115          120          125
Leu Gly Ala Lys Thr Tyr Val Ala Trp Gly Gly Arg Glu Gly Ala Glu
          130          135          140
Ser Gly Gly Ala Lys Asp Val Arg Asp Ala Leu Asp Arg Met Lys Glu
145           150           155           160
Ala Phe Asp Leu Leu Gly Glu Tyr Val Thr Ala Gln Gly Tyr Asp Leu
          165           170           175
Arg Phe Ala Ile Glu Pro Lys Pro Asn Glu Pro Arg Gly Asp Ile Leu
          180          185          190
Leu Pro Thr Val Gly His Ala Leu Ala Phe Ile Glu Arg Leu Glu Arg
          195          200          205
Pro Glu Leu Tyr Gly Val Asn Pro Glu Val Gly His Glu Gln Met Ala
          210          215          220
Gly Leu Asn Phe Pro His Gly Ile Ala Gln Ala Leu Trp Ala Gly Lys
225           230           235           240
Leu Phe His Ile Asp Leu Asn Gly Gln Ser Gly Ile Lys Tyr Asp Gln
          245           250           255
Asp Leu Arg Phe Gly Ala Gly Asp Leu Arg Ala Ala Phe Trp Leu Val
          260          265          270
Asp Leu Leu Glu Thr Ala Gly Tyr Glu Gly Pro Arg His Phe Asp Phe
          275          280          285
Lys Pro Pro Arg Thr Glu Asp Phe Asp Gly Val Trp Ala Ser Ala Ala
          290          295          300

```

ES 2 807 561 T3

Gly Cys Met Arg Asn Tyr Leu Ile Leu Lys Asp Arg Ala Ala Ala Phe
305 310 315 320
Arg Ala Asp Pro Glu Val Gln Glu Ala Leu Arg Ala Ala Arg Leu Asp
 325 330 335
Gln Leu Ala Gln Pro Thr Ala Ala Asp Gly Leu Asp Ala Leu Leu Ala
 340 345 350
Asp Arg Ala Ala Phe Glu Asp Phe Asp Val Asp Ala Ala Ala Ala Arg
 355 360 365
Gly Met Ala Phe Glu His Leu Asp Gln Leu Ala Met Asp His Leu Leu
 370 375 380
Gly Ala Arg Gly
385

REIVINDICACIONES

1. Método para convertir xilosa en xilulosa que comprende las etapas siguientes:
 - a) proporcionar una composición que comprenda agua, xilosa y lignina,
 - b) convertir enzimáticamente la xilosa a xilulosa en presencia de una xilosa isomerasa,
 - 5 c) opcionalmente purificar la xilulosa de la composición,en donde la xilosa isomerasa comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos en el 90 % idéntica a la secuencia según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la composición presenta una absorbancia a 280 nm de al menos 1.0.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde la composición comprende al menos 0.06 gramos por litro de lignina.
- 10 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1- 3, en donde la composición que comprende agua, xilosa y lignina se obtiene del material que contiene lignocelulosa pretratado, como biomasa.
5. Método según la reivindicación 4, en donde la composición que comprende agua, xilosa y lignina se obtiene por hidrólisis, preferiblemente hidrólisis enzimática.
- 15 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1- 5, en donde la composición que comprende agua, xilosa y lignina se obtiene del material de lignocelulosa que contiene celulosa retirando al menos algo de la celulosa.
7. Método según la reivindicación 6, en donde el material de lignocelulosa que contiene celulosa se trata previamente para liberar hemicelulosas.
8. Método según la reivindicación 7, en donde el pretratamiento comprende una etapa de poner en contacto el material de lignocelulosa con ácido.
- 20 9. Método según la reivindicación 5, en donde la hidrólisis enzimática se realiza usando una xilanasa.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 - 9, en donde la biomasa es madera o pulpa de madera.
11. Método según la reivindicación 10, en donde la madera es madera blanda.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11, en donde la xilulosa se purifica.

Figura 1
Actividad relativa

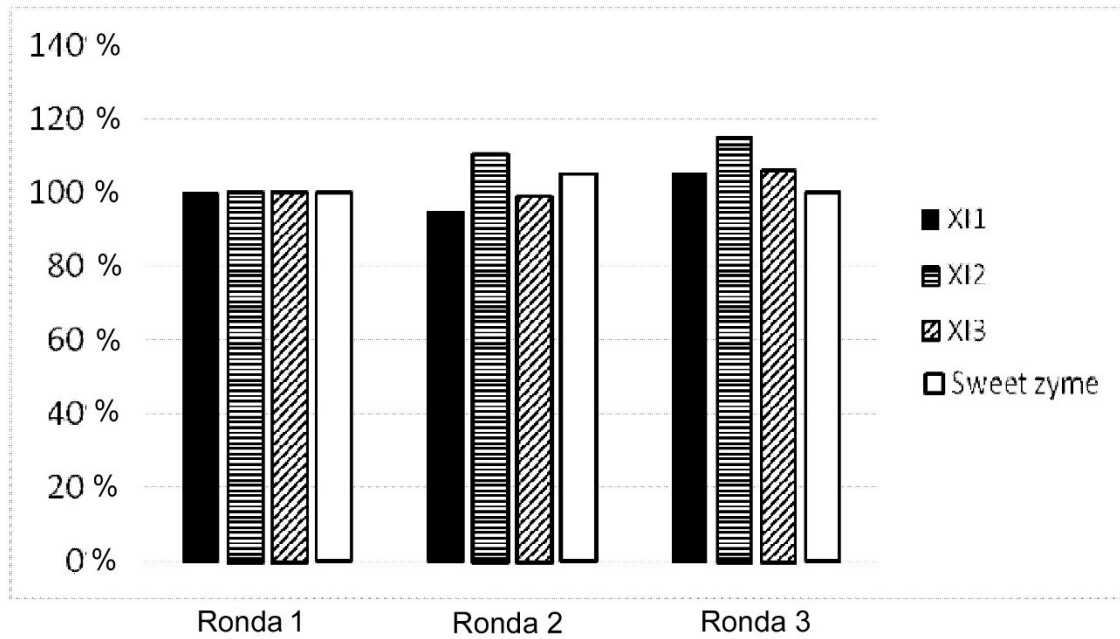


Figura 2
Actividad relativa

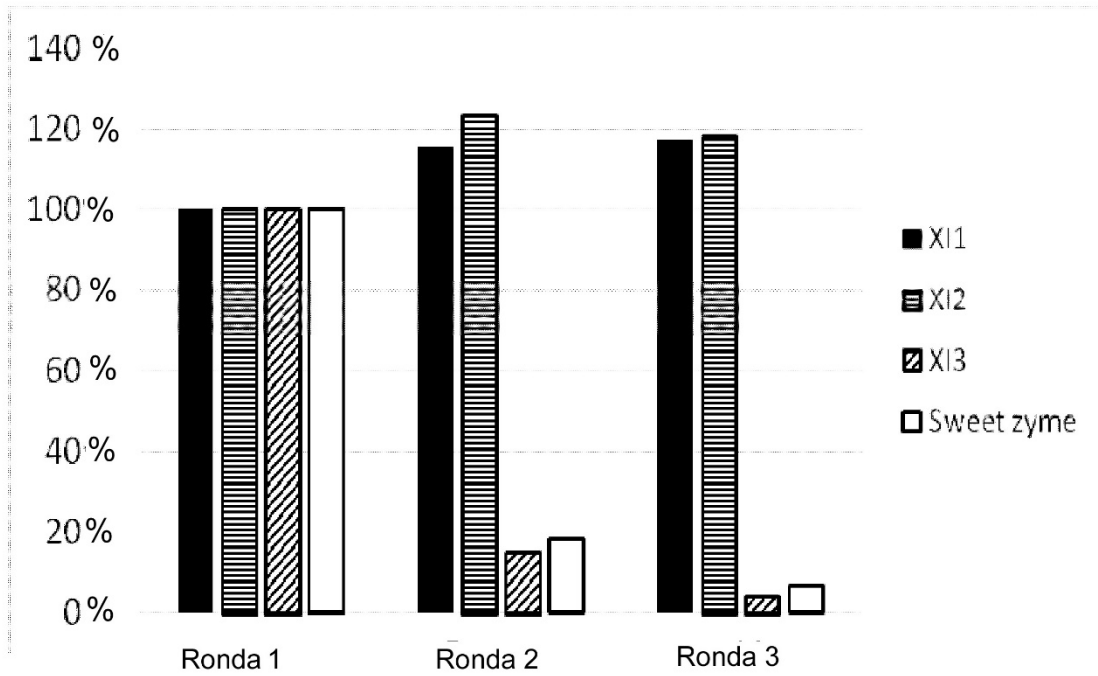


Figura 3

Actividad residual relativa [%]

