

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 026**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2005 E 17165392 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3219806**

54 Título: **Métodos para la degradación o la conversión de polisacáridos de la pared celular vegetal**

30 Prioridad:

25.03.2004 US 556779 P

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

08.03.2021

73 Titular/es:

**NOVOZYMES, INC. (100.0%)
1445 Drew Avenue
Davis, CA 95616, US**

72 Inventor/es:

**BERKA, RANDY y
CHERRY, JOEL**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 810 026 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

Métodos para la degradación o la conversión de polisacáridos de la pared celular vegetal

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a métodos para degradar o convertir polisacáridos de la pared celular vegetal y a productos obtenidos mediante tales métodos.

Descripción de la técnica relacionada

15 [0002] Las paredes celulares vegetales están compuestas por una mezcla de polisacáridos interconectados en una estructura compleja (Carpita y col., 2001, Plant Physiology 127: 551-565). La mezcla de polisacáridos incluye celulosa, xiloglucano (hemicelulosa) y polímeros pécticos, que se componen principalmente de hexosas, por ejemplo, glucosa, galactosa y manosa; pentosas por ejemplo, xilosa y arabinosa; ácidos urónicos por ejemplo, ácido galacturónico y ácido glucurónico; y desoxihexosas por ejemplo, ramnosa y fucosa.

20 [0003] Los polisacáridos de la pared celular vegetal pueden degradarse enzimáticamente en glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa, que luego pueden convertirse en otras sustancias orgánicas; por ejemplo, la levadura fermenta fácilmente la glucosa y la convierte en etanol. La madera, los residuos agrícolas, los cultivos herbáceos y los desechos sólidos municipales se pueden utilizar como fuentes de polisacáridos de la pared celular vegetal.

25 [0004] La celulosa es un componente primario de las paredes celulares vegetales. Muchos microorganismos producen enzimas que degradan la celulosa. Estas enzimas incluyen, por ejemplo, endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas. Las endoglucanasas digieren el polímero celulosa en ubicaciones aleatorias, abriéndolo al ataque de las celobiohidrolasas. Las celobiohidrolasas liberan secuencialmente moléculas de celobiosa desde los extremos del polímero celulosa. La celobiosa es un dímero de glucosa con enlaces beta-1,4 soluble en agua. Las beta-glucosidasas hidrolizan la celobiosa y la convierten en glucosa.

30 [0005] Los microorganismos naturales que degradan la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular pueden no ser ideales para la conversión a gran escala de materiales celulósicos porque (a) puede faltar el complemento completo de enzimas, (b) uno o más componentes enzimáticos tienen un rendimiento deficiente, son lábiles o su comportamiento cinético no cumple con la especificación del uso previsto, (c) la conversión y/o la degradación podría mejorarse mediante la expresión de un gen enzimático heterólogo que mejore la conversión/degradación, o (d) el complemento completo de enzimas puede estar en cantidades insuficientes para ser económicamente viable. Kawamori y col., Agricl. Biol. Chem., 50 (10), pp.2477-2482 (1986.) describen mutantes de *T. reesei* con actividad beta-glucosidasa endógena. Sería una ventaja para la técnica mejorar la degradación y conversión de los polisacáridos de la pared celular vegetal mediante el uso de g de microorganismos recombinantes para evitar costosos pasos de eliminación de células y formulación de enzimas.

45 [0006] Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos métodos para degradar o convertir polisacáridos de la pared celular vegetal en diversos productos usando caldos de fermentación completos usados de microorganismos recombinantes.

Resumen de la invención

50 [0007] La presente invención se refiere a métodos para degradar o convertir polisacáridos de la pared celular vegetal en uno o más productos, que comprende: tratar los polisacáridos de la pared celular vegetal con una cantidad eficaz de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo recombinante, en donde el microorganismo fúngico filamentoso recombinante expresa uno o más genes heterólogos que codifican la beta-glucosidasa.

55 [0008] La presente invención también se refiere a métodos para producir una o más sustancias orgánicas, que comprenden:

60 (a) la sacarificación de polisacáridos de la pared celular vegetal con una cantidad eficaz de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo fúngico filamentoso recombinante, en donde el microorganismo fúngico filamentoso recombinante expresa uno o más genes heterólogos que codifican beta-glucosidasa;

(b) la fermentación del material sacarificado del paso (a) con uno o más microorganismos de fermentación; y

(c) la recuperación de la sustancia o sustancias orgánicas de la fermentación.

65

Breve descripción de las figuras

[0009]

5 La Figura 1 muestra un mapa de restricción de pAILo01.
 La Figura 2 muestra un mapa de restricción de pMJ04.
 La Figura 3 muestra un mapa de restricción de pCaHj527.
 La Figura 4 muestra un mapa de restricción de pMT2188.
 La Figura 5 muestra un mapa de restricción de pCaHj568.
 La Figura 6 muestra un mapa de restricción de pMJ05.
 10 La Figura 7 muestra un mapa de restricción de pSMai130.
 La Figura 8 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 32) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 33) de la secuencia señal de secreción de una beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.
 La Figura 9 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 36) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 37) de la secuencia señal de secreción de una endoglucanasa V de *Humicola insolens*.
 15 La Figura 10 muestra un mapa de restricción de pSMai135.
 La Figura 11 muestra los perfiles de hidrólisis de PCS de caldo de fermentación completo (WB) (panel A) y caldo libre de células (CB) (panel B) con dosis de enzimas que varían de 2,5 a 20 mg/g de PCS (que figuran en la parte inferior derecha de cada panel).
 La Figura 12 muestra las curvas de hidrólisis de PCS para muestras de WB y CB derivadas de material de fermentación de *Trichoderma reesei* RutC30 recién cosechado. Cada perfil se representa como % de rendimiento de RS (% de azúcar reductor máximo teórico basado en la composición de glucano de 10 mg de PCS por ml) en función del tiempo de hidrólisis (1-120 horas). Las dosis de enzimas se observan en la esquina superior derecha de cada panel.
 20 La Figura 13 muestra una comparación del azúcar reductor (RS) total y la glucosa liberados durante las reacciones de hidrólisis de PCS utilizando muestras de WB y CB de *Trichoderma reesei* RutC30. Las dosis de enzimas se observan en la parte superior de cada panel. Los números de muestra indicados en el eje X corresponden a tiempos de hidrólisis que abarcan de 1 a 120 horas.
 La Figura 14 muestra las curvas de hidrólisis de PCS para muestras de WB y CB derivadas de caldo de fermentación de *Trichoderma reesei* SMA135-04 recién cosechado. La cepa de *Trichoderma reesei* SMA135-04 expresa beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* recombinante. Cada perfil se representa como % de rendimiento de RS (% del azúcar reductor máximo teórico basado en la composición de glucano de 10 mg de PCS por ml) en función del tiempo de hidrólisis (1-120 horas). Las dosis de enzimas se observan en la esquina superior derecha de cada panel.
 25 La Figura 15 muestra una comparación del azúcar reductor total (RS) y la glucosa liberados durante las reacciones de hidrólisis de PCS utilizando muestras de WB y CB de *Trichoderma reesei* SMA135-04 con un vector de expresión que dirige la síntesis y secreción de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. Las dosis de enzimas se observan en la parte superior de cada panel. Los números de muestra indicados en el eje X corresponden a tiempos de hidrólisis que abarcan de 1 a 120 horas.
 La Figura 16 muestra las curvas de hidrólisis de PCS para muestras de WB y CB derivadas de caldo de fermentación de *Trichoderma reesei* RutC30 almacenado durante dos semanas a 4 °C. Cada perfil se representa como % de rendimiento de RS (% del azúcar reductor máximo teórico basado en la composición de glucano de 10 mg de PCS por ml) en función del tiempo de hidrólisis (1-120 horas). Las dosis de enzimas se observan en la esquina superior derecha de cada panel.
 30 La Figura 17 muestra las curvas de hidrólisis de PCS para muestras de WB y CB derivadas de caldo de fermentación de *Trichoderma reesei* SMA135-04 almacenado durante dos semanas a 4 °C. Cada perfil se representa como % de rendimiento de RS (% del máximo teórico basado en la composición de glucano de 10 mg/ml de PCS) en función del tiempo de hidrólisis (1-120 horas). Las dosis de enzimas se observan en la esquina superior derecha de cada panel.

50 Descripción detallada de la invención

[0010] La presente invención se refiere a métodos para degradar o convertir polisacáridos de la pared celular vegetal en uno o más productos, que comprenden: tratar los polisacáridos de la pared celular vegetal con una cantidad eficaz de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo recombinante, en donde el microorganismo fúngico filamentoso recombinante expresa uno o más genes heterólogos que codifican la beta-glucosidasa. La presente invención también se refiere a métodos para producir una o más sustancias orgánicas, que comprenden: (a) la sacarificación de polisacáridos de la pared celular vegetal con una cantidad eficaz de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo fúngico filamentoso recombinante, en donde el microorganismo recombinante expresa uno o más genes heterólogos que codifican beta-glucosidasa; (b) la fermentación del material sacarificado del paso (a) con uno o más microorganismos de fermentación; y (c) la recuperación de la sustancia o sustancias orgánicas de la fermentación.

Polisacáridos de la pared celular vegetal

65 [0011] En los métodos de la presente invención, la fuente de los polisacáridos de la pared celular vegetal puede ser cualquier polisacárido de la pared celular que contenga biomasa vegetal. Dichas fuentes incluyen, entre otras,

material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, residuos de papel y residuos de la fabricación de pulpa y papel.

5 [0012] En un aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal son rastrojos de maíz. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal es fibra de maíz. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal es paja de arroz. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal son residuos de procesamiento de papel y pulpa. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal son plantas leñosas o herbáceas. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal es pulpa de fruta. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal es pulpa vegetal. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal es piedra pómez. En otro aspecto preferido, la biomasa de la pared celular vegetal son residuos de destilería.

15 [0013] La biomasa de la pared celular vegetal puede usarse sin tratar o puede someterse a un tratamiento previo usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Tales pretratamientos incluyen pretratamiento físico, químico y biológico. Por ejemplo, las técnicas de pretratamiento físico pueden incluir varios tipos de molienda, trituración, irradiación, explosión de vapor/escaldado y hidrotermólisis. Las técnicas de pretratamiento químico pueden incluir ácido diluido, solvente orgánico, alcalino, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono e hidrotermólisis con pH controlado. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación de microorganismos solubilizadores de lignina (véase, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh, P., Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol., 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson, L., y Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech, 18: 312-331; y Vallander, L., y Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 42: 63-95).

30 [0014] En la presente invención, los polisacáridos de la pared celular vegetal incluyen, pero no se limitan a, celulosa, hemicelulosa y sustancias pécticas.

35 [0015] La celulosa está compuesta de beta-1,4-glucano. La hemicelulosa se compone de beta-1,3-1,4-glucano, xiloglucano, xilano (arabinoxilano), manano (galactomanano), galactano (arabinogalactano) y arabinano. Las sustancias pécticas están compuestas de homogalacturonano (pectina), ramnogalacturonano y xilogalacturonano.

40 [0016] El beta-1,4-glucano está compuesto de glucosa con enlaces beta-1,4. Las enzimas que degradan el beta-1,4-glucano incluyen endoglucanasa, celobiohidrolasa y beta-glucosidasa.

[0017] El beta-1,3-1,4-glucano está compuesto de glucosa con enlaces beta-1,4 interrumpida por glucosa con enlaces beta-1,3. Las enzimas que degradan el beta-1,3-1,4-glucano incluyen endo-beta-1,3(4)-glucanasa, endoglucanasa (beta-glucanasa, celulasa) y beta-glucosidasa.

45 [0018] Los xiloglucanos están compuestos de glucosa con enlaces beta-1,4 con sustituyentes de xilosa con enlaces alfa-1,6. Las enzimas que degradan los xiloglucanos incluyen xiloglucanasa, endoglucanasa y celulasa.

50 [0019] El xilano (arabinoxilano) está compuesto de xilosa con enlaces beta-1,4, con arabinosas con enlaces alfa-1,2 o alfa-1,3. La xilosa puede ser acetilada. El ácido glucurónico también está presente. Las enzimas que degradan xilano incluyen xilanasas, xilosidasas, alfa-arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas y acetilxilanasas esterases.

55 [0020] El manano (galactomanano) está compuesto de manosa con enlaces beta-1,4 con sustituyentes de galactosa con enlaces alfa-1,6. Los sustituyentes de manosa también pueden ser acetilados. Las enzimas que degradan manano incluyen mananasas, manosidasas, alfa-galactosidasas y manano acetil esterases.

[0021] El galactano (arabinogalactano) está compuesto por D-galactosa y 3,6-anhidrogalactosa unidas por enlaces beta-1,3. Las enzimas que degradan galactanos incluyen galactanasas.

60 [0022] El arabinano está compuesto por L-arabinosa con enlaces 1,3-1,5. Las enzimas que degradan el arabinano incluyen arabinanasas.

65 [0023] El homogalacturonano está compuesto de ácido galacturónico con enlaces alfa-1,4. Los sustituyentes del ácido galacturónico pueden estar acetilados y/o metilados. Las enzimas que degradan el homogalacturonano incluyen pectato liasa, pectín, pectato liasa, poligalacturonasa, pectín acetil esterases y pectín metil esterases.

[0024] El ramnogalacturonano se compone de alfa-1,4-ramnosa y ácido galacturónico con enlaces alfa-1,2 alternantes, con cadenas laterales unidas por enlaces 1,4 a ramnosa. Las cadenas laterales incluyen galactano de tipo I, que es galactosa con enlaces beta-1,4 con sustituyentes de arabinosa con enlaces alfa-1,3; galactano de tipo II, que es galactosa con enlaces beta-1,3-1,6 (muy ramificada) con sustituyentes de arabinosa; y arabinano, que es arabinosa con enlaces alfa-1,5 con ramificaciones de arabinosa con enlaces alfa-1,3. Los sustituyentes del ácido galacturónico pueden estar acetilados y/o metilados. Las enzimas que degradan el ramnogalacturonano incluyen alfa-arabinofuranosidasa, beta-galactosidasa, galactanasa, arabinanasa, alfa-arabinofuranosidasa, rhamnogalacturonasa, ramnogalacturonano liasa y ramnogalacturonano acetil esterasa.

[0025] El xilogalacturonano está compuesto de ácido galacturónico con enlaces alfa-1,4 con cadenas laterales de xilosa. La galactosa y la fucosa pueden estar unidas a los sustituyentes de xilosa. La ramnosa también está presente. Los sustituyentes del ácido galacturónico pueden estar acetilados y/o metilados. Las enzimas que degradan el xilogalacturonano incluyen xilogalacturonosidasa, xilogalacturonasa y ramnogalacturonano liasa.

[0026] La celulosa también puede estar presente como lignocelulosa. La lignina se compone de unidades de fenilpropano metoxiladas unidas por enlaces éter y enlaces C-C. La composición química de la lignina difiere según la especie de la planta. Dichos componentes incluyen grupos siringilo, guayacilo y 4-hidroxifenilo. Las enzimas que degradan el componente de lignina de la lignocelulosa incluyen lignina peroxidasa, peroxidasa dependientes de manganeso, peroxidasa híbridas, con propiedades combinadas de las peroxidasa de lignina y las peroxidasa dependientes de manganeso y lacasa (Vicuna, 2000, Molecular Biotechnology 14: 173-176; Broda y col., 1996, Molecular Microbiology 19: 923-932).

Microorganismos recombinantes

[0027] En los métodos de la presente invención, el microorganismo recombinante puede ser cualquier microorganismo fúngico filamentoso que sea útil como huésped para la producción recombinante de enzimas útiles en la conversión o degradación de los polisacáridos de la pared celular vegetal. El microorganismo elegido como huésped para la producción recombinante puede contener ya uno o más genes nativos que codifican enzimas que degradan o convierten los polisacáridos de la pared celular vegetal. Sin embargo, el huésped puede carecer del complemento completo de enzimas necesario para degradar o convertir los polisacáridos de la pared celular vegetal, es decir, el huésped puede carecer de uno o más genes. Alternativamente, el huésped puede contener el complemento completo de enzimas, pero una o más enzimas pueden estar expresadas pobremente. Además, el huésped puede carecer de uno o más genes necesarios para producir el complemento completo de enzimas y una o más enzimas que produce el huésped pueden estar expresadas pobremente. Se entenderá en la presente invención que un gen nativo del huésped que ha sido manipulado, como se describe aquí, se considerará un gen heterólogo.

[0028] El huésped fúngico es una cepa fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según la definición de Hawksworth y col. 1995, *supra*). Los hongos filamentosos generalmente se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es necesariamente aeróbico. En contraste, el crecimiento vegetativo de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* es por gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

[0029] En un aspecto más preferido, el huésped fúngico filamentoso es, pero no se limita a, una cepa de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Scytalidium*, *Thielavia*, *Tolyocladium*, o *Trichoderma*.

[0030] En un aspecto aún más preferido, el huésped fúngico filamentoso es una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto aún más preferido, el huésped fúngico filamentoso es una cepa de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto aún más preferido, el huésped fúngico filamentoso es una cepa de *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Scytalidium thermophilum*, o *Thielavia terrestris*. En otro aspecto aún más preferido, el huésped fúngico filamentoso es una cepa de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0031] En un aspecto más preferido, el huésped fúngico filamentoso es *Trichoderma reesei* RutC30, que está disponible en la American Type Culture Collection como *Trichoderma reesei* ATCC 56765.

[0032] En un aspecto preferido, el huésped o microorganismo recombinante comprende uno o más genes heterólogos que codifican la beta-glucosidasa.

[0033] En otro aspecto más preferido, el microorganismo recombinante comprende genes heterólogos que codifican una endoglucanasa y una beta-glucosidasa.

5 [0034] En otro aspecto más preferido, el microorganismo recombinante comprende genes heterólogos que codifican una endoglucanasa, una celobiohidrolasa y una beta-glucosidasa.

[0035] En otro aspecto preferido, el microorganismo recombinante comprende además una glucohidrolasa.

10 [0036] En otro aspecto preferido, el microorganismo recombinante comprende además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas seleccionadas del grupo que consiste en xiloglucanasa, xilanasas, xilosidasas, alfa-arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas y acetilxilano esterasas.

15 [0037] En otro aspecto preferido, el microorganismo recombinante comprende además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas seleccionadas del grupo que consiste en mananasa, manosidasas, alfa-galactosidasas, manano acetil esterasa, galactanasas y arabinanasas.

20 [0038] En otro aspecto preferido, el microorganismo recombinante comprende además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas seleccionadas del grupo que consiste en pectato liasa, pectín, poligalacturonasa, pectín acetil esterasa, pectín metil esterasa, beta-galactosidasas, galactanasas, arabinanasas, alfa-arabinofuranosidasas, ramnogalacturonasa, ramnogalacturonano acetil esterasa, xilogalacturonosidasas, xilogalacturonasa, y ramnogalacturonano liasa.

25 [0039] En otro aspecto preferido, el microorganismo recombinante comprende además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una lignina peroxidasa, peroxidasa dependiente de manganeso y peroxidasa híbrida.

30 [0040] En otro aspecto preferido, el microorganismo recombinante comprende además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una esterasa, lipasa, oxidasa, fosfolipasa, fitasa, proteasa y peroxidasa.

35 [0041] Un gen que codifica una enzima que degrada o convierte la pared celular vegetal puede ser de origen fúngico o bacteriano, por ejemplo, de especies de *Humicola*, *Coprinus*, *Thielavia*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Scytalidium*, *Penicillium* o *Aspergillus* (véase, por ejemplo, la EP 458162), especialmente las seleccionadas de la especie *Humicola insolens* (reclasificada como *Scytalidium thermophilum*, véase por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4,435,307), *Coprinus cinereus*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Meripilus giganteus*, *Thielavia terrestris*, *Acremonium sp.*, *Acremonium persicinum*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium brachyphenium*, *Acremonium dichromosporum*, *Acremonium obrevareum*, *Acremonium*, *Acremonium*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium acremonium*, *Acremonium* y *Acremonium furatum*;
40 preferiblemente de la especie *Humicola insolens* DSM 1800, *Fusarium oxysporum* DSM 2672, *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, *Cephalosporium sp.* RYM-202, *Acremonium sp.* CBS 478.94, *Acremonium sp.* CBS 265.95, *Acremonium persicinum* CBS 169.65, *Acremonium acremonium* AHU 9519, *Cephalosporium sp.* CBS 535.71, *Acremonium brachyphenium* CBS 866.73, *Acremonium dichromosporum* CBS 683.73, *Acremonium obclavatum* CBS 311.74, *Acremonium pinkertoniae* CBS 157.70, *Acremonium roseogriseum* CBS 134.56,
45 *Acremonium incoloratum* CBS 146.62, y *Acremonium furatum* CBS 299.70H. Los genes de la enzima hidrolítica de la pared celular vegetal también se pueden obtener de *Trichoderma* (particularmente *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, y *Trichoderma koningii*), *Bacillus* alcalófilo (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 3,844,890 y EP 458162) y *Streptomyces* (véase, por ejemplo, EP 458162).

50 [0042] Las enzimas y sus genes a los que se hace referencia en el presente documento pueden obtenerse de cualquier origen adecuado, incluyendo origen bacteriano, fúngico, de levadura o de mamíferos. El término "obtener" según se usa en el presente documento en relación con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado la secuencia de nucleótidos de la fuente. En el significado de una enzima nativa se incluyen las variantes naturales o las
55 variantes obtenidas, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida o barajado.

[0043] Las técnicas utilizadas para aislar o clonar un gen que codifica una enzima son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento del ADN genómico, la preparación de ADNc o una combinación de estos. La clonación de un gen a partir de dicho ADN genómico puede efectuarse, por ejemplo, mediante el uso de la conocida reacción
60 en cadena de la polimerasa (PCR) o la búsqueda de anticuerpos en bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. véase, por ejemplo, Innis y col., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación basada en la secuencia de nucleótidos (NASBA).

65

[0044] Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera ya conocida de por sí. En la EP 238 023 y Yelton y col., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474 se describen procedimientos adecuados para la transformación de cepas huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma*. En Malardier y col., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787 se describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium*. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito y col., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen y col., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Enzimas que tienen actividad hidrolítica de la pared celular vegetal y sus genes

[0045] En los métodos de la presente descripción, el microorganismo recombinante comprende uno o más genes que son heterólogos o exógenos al microorganismo, en donde dicho uno o más genes codifican enzimas involucradas en la degradación o conversión de los polisacáridos de la pared celular vegetal.

[0046] Los genes heterólogos pueden codificar enzimas que degradan el beta-1,4-glucano, como la endoglucanasa (celulasa), la celobiohidrolasa, la glucohidrolasa y la beta-glucosidasa; que degradan el beta-1,3-1,4-glucano tal como la endo-beta-1,3(4)-glucanasa, endoglucanasa (beta-glucanasa, celulasa) y beta-glucosidasa; que degradan xiloglucanos tales como la xiloglucanasa, endoglucanasa y celulasa; que degradan el xilano tales como la xilanas, xilosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, alfa-glucuronidasa y acetilxilano esterasa; que degradan el manano tal como la mananasa, manosidasa, alfa-galactosidasa y manano acetil esterasa; que degradan el galactano tal como la galactanasa; que degradan el arabinano tal como la arabinanasa; que degradan el homogalacturonano tal como la pectato liasa, pectín, pectato liasa, poligalacturonasa, pectín acetil esterasa y pectín metil esterasa; que degradan el ramnogalacturonano tal como la alfa-arabinofuranosidasa, beta-galactosidasa, galactanasa, arabinanasa, ramnogalacturonasa, ramnogalacturonano liasa y ramnogalacturonano acetil esterasa; que degradan el xilogalacturonano tal como xilogalacturonosidasa, xilogalacturonasa y ramnogalacturonano liasa; y que degradan la lignina como las peroxidases de lignina, peroxidases dependientes de manganeso, peroxidases híbridas, con propiedades combinadas de peroxidases de lignina y peroxidases dependientes de manganeso, y lacasas.

[0047] Los genes que codifican las enzimas que degradan polisacáridos se pueden obtener de las fuentes descritas por B. Henrissat, 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat B., y Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0048] El microorganismo recombinante puede comprender además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas tales como esterases, lipasas, oxidasas, fosfolipasas, fitasas, proteasas y peroxidases.

[0049] Las enzimas pueden tener actividad en el rango de pH ácido, neutro o alcalino. En un aspecto preferido, las enzimas tienen actividad en el intervalo de pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 7.

Endoglucanasas

[0050] El término "endoglucanasa" se define aquí como una endo-1,4-(1,3; 1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (n.º EC 3.2.1.4) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, derivados de celulosa (como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mixtos como beta-D-glucanos o xiloglucanos de cereales, y otros materiales vegetales que contienen componentes celulósicos. Para los fines de la presente invención, la actividad endoglucanasa se determina usando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) de acuerdo con el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem 59: 257-268.

[0051] En un aspecto preferido, se obtiene un gen de endoglucanasa de una cepa de *Trichoderma reesei*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de endoglucanasa de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de endoglucanasa de una cepa de *Aspergillus aculeatus*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de endoglucanasa de una cepa de *Humicola insolens*.

[0052] Los ejemplos preferidos de genes de endoglucanasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Aspergillus aculeatus* (Patente de EE. UU. n.º 6,623,949; WO 94/14953), *Aspergillus kawachii* (Patente de EE. UU. n.º 6623949), *Aspergillus oryzae* (Kitamoto y col., 1996, Appl. Microbiol Biotechnology 46: 538-544; Patente de EE. UU. n.º 6,635,465), *Aspergillus nidulans* (Lockington y col., 2002, Fungal Genet. Biol. 37: 190-196), *Cellulomonas fimi* (Wong y col., 1986, Gene 44: 315-324), *Bacillus subtilis* (MacKay y col., 1986, Nucleic Acids Res. 14: 9159-9170), *Cellulomonas pachnodae* (Cazemier y col., 1999, Appl. Microbiol Biotechnology 52: 232-239), *Fusarium equiseti* (Goedegebuur y col., 2002, Curr. genet. 41: 89-98), *Fusarium oxysporum* (Hagen y col., 1994, Gene 150: 163-167; Sheppard y col., 1994, Gene 150: 163-167), *Humicola insolens* (Patente de EE. UU. n.º 5,912,157; Davies y col., 2000, Biochem J. 348: 201-207), *Hypocrea jecorina* (Penttila y col., 1986, Gene 45: 253-263), *Humicola grisea* (Goedegebuur y col., 2002, Curr. genet. 41: 89-98), *Micromonospora cellulolyticum* (Lin y

col., 1994, J. Ind. Microbiol. 13: 344-350), *Myceliophthora thermophila* (Patente de EE. UU. n.º 5,912,157), *Rhizopus oryzae* (Moriya y col., 2003, J. Bacteriol. 185: 1749-1756), *Trichoderma reesei* (Saloheimo y col., 1994, Mol. Microbiol. 13: 219-228) y *Trichoderma viride* (Kwon y col., 1999, Biosci. Biotechnology Biochem. 63: 1714-1720; Goedegebuur y col., 2002, Curr. genet. 41: 89-98).

5

Celobiohidrolasas

[0053] La celobiohidrolasa, una exo-1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, celooligosacáridos o cualquier polímero con enlaces beta-1,4 que contenga glucosa, liberando celobiosa de los extremos reductores o no reductores de la cadena. Para los fines de la presente invención, la actividad celobiohidrolasa se determina de acuerdo con los procedimientos descritos por Lever y col., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh y col., 1982, FEBS Letters, 149: 152-156; y van Tilbeurgh y Claeysens, 1985, FEBS Letters, 187: 283-288. En la presente invención, el método de Lever y col. se emplea para evaluar la hidrólisis de la celulosa en rastrojo de maíz, mientras que los métodos de van Tilbeurgh y col. se usan para determinar la actividad celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente.

10

15

[0054] En un aspecto preferido, se obtiene un gen de celobiohidrolasa de una cepa de *Trichoderma reesei*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de celobiohidrolasa de una cepa de *Aspergillus aculeatus*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de celobiohidrolasa de una cepa de *Aspergillus niger*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de celobiohidrolasa de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de celobiohidrolasa de una cepa de *Emericella nidulans*.

20

[0055] Los ejemplos preferidos de genes de celobiohidrolasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Acremonium cellulolyticus* (patente de EE. UU. n.º 6,127,160), *Agaricus bisporus* (Chow y col., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 2779-2785; Yague y col., 1997, Microbiology (Reading, Engl.) 143: 239-244), *Aspergillus aculeatus* (Takada y col., 1998, J. Ferment. Bioeng 85: 1-9), *Aspergillus niger* (Gielkens y col., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 4340-4345), *Aspergillus oryzae* (Kitamoto y col., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnology 46: 538-544), *Athelia rolfsii* (Número de acceso EMBL AB103461), *Chaetomium thermophilum* (Números de acceso EMBL AX657571 y CQ838150), *Cullulomonas fimi* (Meinke y col., 1994, Mol. Microbiol. 12: 413-422), *Emericella nidulans* (Lockington y col., 2002, Fungal Genet. Biol. 37: 190-196), *Fusarium oxysporum* (Hagen y col., 1994, Gene 150: 163-167), *Geotrichum* sp. 128 (número de acceso EMBL AB089343), *Humicola grisea* (de Oliviera y Radford, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 668; Takashima y col., 1998, J. Biochem. 124: 717-725), *Humicola nigrescens* (Número de acceso EMBL AX657571), *Hypocrea koningii* (Teeri y col., 1987, Gene 51: 43-52), *Myceliophthora thermophila* (Números de acceso EMBL AX657599), *Neocallimastix patriciarum* (Denman y col., 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62 (6), 1889-1896), *Phanerochaete chrysosporium* (Tempelaars y col., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 4387-4393), *Thermobifida fusca* (Zhang, 1995, Biochemistry 34: 3386-3395), *Trichoderma reesei* (Terri te al., 1983, Bio/Technology 1: 696-699; Chen y col., 1987, Bio/Technology 5: 274-278) y *Trichoderma viride* (Números de acceso a EMBL A4368686 y A4368688).

25

30

35

Beta-glucosidasa

[0056] La beta-glucosidasa, una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21), cataliza la hidrólisis de los residuos terminales no reductores de beta-D-glucosa con la liberación de beta-D-glucosa. Para los fines de la presente invención, la actividad beta-glucosidasa se determina de acuerdo con el procedimiento básico descrito por Venturi y col., 2002, J. Basic Microbiol. 42: 55-66, excepto en que se emplearon diferentes condiciones como se describe en el presente documento. Una unidad de actividad beta-glucosidasa se define como 1,0 µmol de p-nitrofenol producido por minuto a 50 °C, pH 5 a partir de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido 4 mM como sustrato en citrato de sodio 100 mM, Tween-20 al 0,01%

45

[0057] Abarcadas dentro de la definición de las beta-glucosidasas están las celobiasas. Las celobiasas hidrolizan la celobiosa en glucosa.

50

[0058] En un aspecto preferido, se obtiene un gen de beta-glucosidasa de una cepa de *Aspergillus aculeatus*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de beta-glucosidasa de una cepa de *Aspergillus kawachi*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de beta-glucosidasa de una cepa de *Trichoderma reesei*.

55

[0059] Los ejemplos preferidos de genes de beta-glucosidasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Aspergillus aculeatus* (Kawaguchi y col., 1996, Gene 173: 287-288), *Aspergillus kawachi* (Iwashita y col., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 5546-5553), *Aspergillus oryzae* (WO 2002/095014), *Cellulomonas biazotea* (Wong y col., 1998, Gene 207: 79-86), *Penicillium funiculosum* (WO 2004/78919), *Saccharomycopsis fibuligera* (Machida y col., 1988, Appl. Environ. Microbiol. 54: 3147-3155), *Schizosaccharomyces pombe* (Wood y col., 2002, Nature 415: 871-880) y *Trichoderma reesei* (Barnett y col., 1991, Bio/Technology 9: 562-567).

60

Glucohidrolasas

65

[0060] La glucohidrolasa, una exo-1,4-beta-D-glucano glucohidrolasa (EC 3.2.1.74), cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4 (enlaces O-glucosilo) en 1,4-beta-D-glucanos para eliminar sucesivas unidades de glucosa. Para los fines de la presente invención, la actividad exoglucanasa se determina de acuerdo con el procedimiento descrito por Himmel y col., 1986, J. Biol. Chem 261: 12948-12955.

[0061] En un aspecto preferido, se obtiene un gen de glucohidrolasa de una cepa de *Trichoderma reesei*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de glucohidrolasa de una cepa de *Humicola insolens*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de glucohidrolasa de una cepa de *Aspergillus niger*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de celobiohidrolasa de una cepa de *Chaetomium thermophilum*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de glucohidrolasa de una cepa de *Thermoascus aurantiacus*. En otro aspecto preferido, se obtiene un gen de glucohidrolasa de una cepa de *Thielavia terrestris*.

Hemicelulasas

[0062] La hidrólisis enzimática de la hemicelulosa puede ser realizada por una amplia variedad de hongos y bacterias (Saha, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnology 30: 279-291). De manera similar a la degradación de la celulosa, la hidrólisis de hemicelulosa requiere la acción coordinada de varias enzimas. Las hemicelulasas pueden clasificarse en tres categorías generales: las enzimas endoactivas que atacan los enlaces internos dentro de la cadena de polisacáridos, las enzimas exoactivas que actúan de manera procesadora desde el extremo reductor o no reductor de la cadena de polisacáridos, y las enzimas accesorias, acetilesterasas y estererasas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de la lignina, como la esterasa de ácido cumárico y la esterasa de ácido ferúlico (Wong, K.K.Y., Tan, L. U. L. y Saddler, J. N., 1988, Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications, Microbiol. Rev., 52: 305-317; Tenkanen, M., y Poutanen, K., 1992, Significance of esterases in the degradation of xylans, in Xylans and Xylanases, Visser, J., Beldman, G., Kuster-van Someren, M. A., y Voragen, A. G. J., eds., Elsevier, New York, NY, 203-212; Coughlan, M. P., y Hazlewood, G. P., 1993, Hemicellulose and hemicellulases, Portland, London, UK; Brigham, J. S., Adney, W. S., y Himmel, M. E., 1996, Hemicellulases: Diversity and applications, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 119-141).

[0063] Los ejemplos de hemicelulasas endoactivas y enzimas accesorias incluyen endoarabinanasa, endoarabinogalactanasa, endoglucanasa, endomananasa, endoxilanasa y feraxano endoxilanasa. Los ejemplos de hemicelulasas exoactivas y enzimas accesorias incluyen α -L-arabinosidasa, β -L-arabinosidasa, α -1,2-L-fucosidasa, α -D-galactosidasa, β -D-galactosidasa, β -D-glucosidasa, β -D-glucuronidasa, β -D-manosidasa, β -D-xilosidasa, exo-glucosidasa, exo-celobiohidrolasa, exo-manonobiohidrolasa, exo-mananasa, exo-xilanasa, xilano- α -glucuronidasa y coniferina β -glucosidasa. Los ejemplos de estererasas incluyen acetil estererasas (acetilgalactano esterasa, acetilmanano esterasa y acetilxilano esterasa) y aril estererasas (esterasa de ácido cumárico y esterasa de ácido ferúlico).

[0064] Las hemicelulasas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, acetilxilano estererasas, glucuronidasas, endogalactanasas, mananasas, endo- o exo-arabinasas, exo-galactanasas y mezclas de estas. Preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa con modo de acción exo, y más preferiblemente, una hemicelulasa con modo de acción exo que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa preferiblemente en el intervalo de pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 7.

[0065] Se puede obtener una hemicelulasa, tal como una xilanasa, arabinofuranosidasa, acetilxilano esterasa, glucuronidasa, endogalactanasa, mananasa, endo- o exo-arabinasa, o exo-galactanasa, o genes de estas, de cualquier fuente adecuada, incluyendo organismos fúngicos y bacterianos, como *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Thermomyces*, y *Bacillus*.

[0066] Los ejemplos preferidos de genes de hemicelulasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Acidobacterium capsulatum* (Inagaki y col., 1998, Biosci. biotechnology Biochem. 62: 1061-1067), *Agaricus bisporus* (De Groot y col., 1998, J. Mol. Biol. 277: 273-284), *Aspergillus aculeatus* (patente de EE. UU. n.º 6,197,564; patente de EE. UU. n.º 5,693,518), *Aspergillus kawachii* (Ito y col., 1992, Biosci. biotechnology Biochem. 56: 906-912), *Aspergillus niger* (Número de acceso EMBL AF108944), *Magnaporthe grisea* (Wu y col., 1995, Mol. Plant Microbe Interact. 8: 506-514), *Penicillium chrysogenum* (Haas y col., 1993, Gene 126: 237-242), *Talaromyces emersonii* (WO 02/24926) y *Trichoderma reesei* (Números de acceso EMBL X69573, X69574 y AY281369).

Enzimas degradadoras de lignina

[0067] La lignina es un polímero aromático que se encuentra en el tejido leñoso de las plantas superiores. Debido a su hidrofobicidad y estructura aleatoria compleja que carece de enlaces hidrolizables regulares, la mayoría de los organismos degradan poco la lignina. Los mejores degradadores de la lignina son los hongos de pudrición blanca que producen peroxidadas y lacasas extracelulares, que están involucradas en el ataque inicial de la lignina.

[0068] Las enzimas degradadoras de la lignina incluyen, pero no se limitan a, peroxidadas de lignina, peroxidadas dependientes de manganeso, peroxidadas híbridas, con propiedades combinadas de peroxidadas de lignina y

peroxidasa dependientes de manganeso, y lacasas (Vicuña, 2000, *supra*; Broda y col. 1996, *supra*). El peróxido de hidrógeno, requerido como co-sustrato por las peroxidasa, puede generarse por glucosa oxidasa, aril alcohol oxidasa y/o lignina peroxidasa activada por glioxal oxidasa.

5 [0069] La peroxidasa dependiente de manganeso es una peroxidasa muy común producida por hongos de pudrición blanca. La peroxidasa tiene un ciclo catalítico que implica una oxidación de 2 electrones del hemo por peróxido de hidrógeno y la posterior oxidación del compuesto I a través del compuesto II en dos pasos de 1 electrón a la enzima nativa. El mejor sustrato reductor para los compuestos I y II es Mn (II), un metal presente de forma natural en la madera. El Mn (III) formado oxida otros sustratos.

10 [0070] Se sabe que los ácidos orgánicos como el oxalato, el glioxilato y el lactato tienen un papel importante en el mecanismo de degradación de la peroxidasa y la lignina dependientes de manganeso. El Mn (III) es eliminado de la enzima por ácidos orgánicos, y el complejo de ácido orgánico Mn (III) producido actúa como un mediador difusible en la oxidación de la lignina por la peroxidasa dependiente de manganeso. El Mn (III) también puede oxidar ácidos orgánicos, produciendo radicales. Los ácidos orgánicos también pueden ser suministrados por la degradación de la lignina y por microorganismos.

15 [0071] Las enzimas que degradan la lignina y sus genes pueden obtenerse de una cepa de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis subvermispota* (véase WO 02/079400), *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

25 [0072] Los ejemplos preferidos de genes que codifican enzimas degradadoras de lignina que pueden usarse en la invención se obtienen de *Bjerkandera adusta* (WO 2001/098469), *Ceriporiopsis subvermispota* (Conesa y col., 2002, Journal of Biotechnology 93: 143-158), *Cantharellus cibarius* (Ng y col., 2004, Biochemical and Biophysical Research Communications 313: 37-41), *Coprinus cinereus* (WO 97/008325; Conesa y col. 2002, *supra*), *Lentinula edodes* (Nagai y col., 2002, Applied Microbiology and Biotechnology 60: 327-335, 2002), *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen y col., 2004, FEBS Letters 576: 251-255, 2004), *Myceliophthora thermophila* (WO 95/006815), *Phanerochaete chrysosporium* (Conesa y col. 2002, *supra*; Martínez, 2002, Enzyme and Microbial Technology 30: 425-444, 2002), *Phlebia radiata* (Conesa y col. 2002, *supra*), *Pleurotus eryngii* (Conesa y col. 2002, *supra*), *Polyporus pinsitus* (WO 96/000290), *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia y col., 2004, Journal of Molecular Biology 342: 1519-1531), *Rhizoctonia solani* (WO 96/007988), *Scytalidium thermophilum* (WO 95/033837), *Tricholoma giganteum* (Wang y col., 2004, Biochemical and Biophysical Research Communications 315: 450-454) y *Trametes versicolor* (Conesa y col. 2002, *supra*).

Esterasas

40 [0073] La esterasa, una hidrolasa de ester carboxílico (EC 3.1.1), cataliza la hidrólisis de los enlaces éster. Las esterasas útiles en la degradación o conversión de los polisacáridos de la pared celular vegetal incluyen acetil esterasas como la acetilgalactano esterasa, acetilmanano esterasa y acetilxilano esterasa, y las esterasas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de lignina, como la esterasa de ácido cumárico y la esterasa de ácido ferúlico.

45 [0074] Los ejemplos no limitantes de esterasas incluyen arilesterasa, triacilglicerol lipasa, acetiliterasa, acetilcolinesterasa, colinesterasa, tropinesterasa, pectinesterasa, esterol esterasa, clorofilasa, L-arabinonolactonasa, gluconolactonasa, uronolactonasa, tanasa, retinil-palmitato esterasa, hidroxibutirato-dímero hidrolasa, acilglicerol lipasa, 3-oxoadipato enol-lactonasa, 1,4-lactonasa, galactolipasa, 4-piridoxolactonasa, acilcarnitina hidrolasa, aminoacil-tRNA hidrolasa, D-arabinonolactonasa, 6-fosfogluconolactonasa, fosfolipasa A1, 50 6-acetilglucosa deacetilasa, lipoproteína lipasa, dihidrocumarina lipasa, limonina-D-anillo-lactonasa, esteroide-lactonasa, triacetato lactonasa, actinomicina lactonasa, orselinato depsido hidrolasa, cefalosporina-C deacetilasa, clorogenato hidrolasa, alfa-aminoácido esterasa, 4-metiloxaloacetato esterasa, carboximetilbutenolidasa, desoxilimonato A-anillo-lactonasa, 2-acetil-1-alquilglicerofosfocolina esterasa, fusarinina-C ornitinersterasa, sinapina esterasa, hidrolasa de éster de cera, forbol-diéster hidrolasa, fosfatidilinositol deacilasa, sialato O-acetilesterasa, acetoxibutinilbitiofeno deacetilasa, acetilsalicilato deacetilasa, metilumbeliferil-acetato deacetilasa, 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa, N-acetilgalactosaminoglucano deacetilasa, esterasa de hormona juvenil, bis(2-etilhexil)ftalato esterasa, proteína-glutamato metilesterasa, 11-cis-retinil-palmitato hidrolasa, retinil-palmitato todo trans hidrolasa, L-ramnono-1,4-lactonasa, 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitiofen deacetilasa, sintasa de ester 55 etílico de acilo graso, xilono-1,4-lactonasa, N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol deacetilasa, cetraxato bencilsterasa, acetilalquilglicerol acetilhidrolasa y acetilxilano esterasa.

[0075] Las esterasas preferidas para usar en la presente invención son enzimas lipolíticas, tales como lipasas (EC 3.1.1.3, EC 3.1.1.23 y/o EC 3.1.1.26) y fosfolipasas (EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32), que incluyen lisofosfolipasas clasificadas por EC 3.1.1.5). Otras esterasas preferidas son las cutinasas (EC 3.1.1.74). Otras esterasas preferidas son la acetilxilano esterasa y la pectín metilesterasa.

65

[0076] La esterasa se puede agregar en una cantidad eficaz para obtener el beneficio deseado para mejorar el rendimiento del caldo completo usado o de un microorganismo fermentador, por ejemplo, para cambiar la composición/concentración de lípidos dentro y/o fuera del microorganismo fermentador o en la membrana celular del microorganismo fermentador, para dar como resultado una mejora en el movimiento de solutos dentro y/o fuera de los microorganismos fermentadores durante la fermentación y/o para proporcionar más fuentes de energía metabolizables (como, por ejemplo, al convertir componentes, como el aceite del sustrato de maíz, en componentes útiles para el microorganismo fermentador, por ejemplo, ácidos grasos insaturados y glicerol), para aumentar el rendimiento de etanol. Los ejemplos de cantidades eficaces de esterasa son de 0,01 a 400 UL/g de MS (materia seca). Preferiblemente, la esterasa se usa en una cantidad de 0,1 a 100 UL/g de MS, más preferiblemente de 0,5 a 50 UL/g de MS, e incluso más preferiblemente de 1 a 20 UL/g de MS. Se puede obtener una mayor optimización adicional de la cantidad de esterasa usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

[0077] Una unidad de lipasa (UL) es la cantidad de enzima que libera 1,0 μmol de ácido graso titulable por minuto con tributirina como sustrato y goma arábica como emulsionante a 30 °C, pH 7,0 (tampón fosfato).

[0078] En un aspecto preferido, la esterasa es una enzima lipolítica, más preferiblemente, una lipasa. Como se usa en el presente documento, una "enzima lipolítica" se refiere a lipasas y fosfolipasas (incluyendo lisofosfolipasas). En un aspecto más preferido, la enzima lipolítica es una lipasa. Las lipasas pueden aplicarse en este caso por su capacidad para modificar la estructura y composición de aceites y grasas con triglicéridos en los medios de fermentación (incluida la levadura de fermentación), por ejemplo, a partir de un sustrato de maíz. Las lipasas catalizan diferentes tipos de conversiones de triglicéridos, como la hidrólisis, la esterificación y la transesterificación. Las lipasas adecuadas incluyen lipasas ácidas, neutras y básicas, ya conocidas en la técnica, aunque las lipasas ácidas (tales como, por ejemplo, la lipasa G AMANO 50, comercializada por Amano) parece ser más eficaces a concentraciones más bajas de lipasa en comparación con las lipasas neutras o básicas. Las lipasas preferidas para usar en la presente invención incluyen lipasa de *Candida antártica* y lipasa de *Candida cylindracea*. Las lipasas más preferidas son lipasas purificadas tales como lipasa de *Candida antártica* (lipasa A), lipasa de *Candida antártica* (lipasa B), lipasa de *Candida cylindracea* y lipasa de *Penicillium camembertii*.

[0079] La lipasa puede ser la lipasa descrita en la patente EP 258,068-A o puede ser una variante de lipasa tal como una variante descrita en WO 00/60063 o WO 00/32758.

[0080] Las lipasas están presentes preferiblemente en cantidades de aproximadamente 1 a 400 UL/g de MS, preferiblemente de 1 a 10 UL/g de MS, y más preferiblemente de 1 a 5 UL/g de MS.

[0081] La enzima lipolítica es preferiblemente de origen microbiano, en particular, de origen bacteriano, fúngico o de levadura. La enzima lipolítica o el gen de la misma utilizado/a se puede obtener de cualquier fuente, que incluye, por ejemplo, una cepa de *Absidia*, en particular *Absidia blakesleena* y *Absidia corymbifera*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aeromonas*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aureobasidium*, en particular *Aureobasidium pullulans*, una cepa de *Bacillus*, en particular *Bacillus pumilus*, *Bacillus strearothermophilus*, y *Bacillus subtilis*, una cepa de *Beauveria*, una cepa de *Brochothrix*, en particular *Brochothrix thermosohata*, una cepa de *Candida*, en particular *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*), *Candida paralipolytica*, y *Candida antarctica*, una cepa de *Chromobacter*, en particular *Chromobacter viscosum*, una cepa de *Coprinus*, en particular *Coprinus cinerius*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, y *Fusarium venenatum*, una cepa de *Geotricum*, en particular *Geotricum penicillatum*, una cepa de *Hansenula*, en particular *Hansenula anomala*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola brevispora*, *Humicola brevis var. thermoidea* y *Humicola insolens*, una cepa de *Hiphozyma*, una cepa de *Lactobacillus*, en particular *Lactobacillus curvatus*, una cepa de *Metarhizium*, una cepa de *Mucor*, una cepa de *Paecilomyces*, una cepa de *Penicillium*, en particular *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum* y *Penicillium expansum*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia* (sin. *Burkholderia cepacia*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas mephitica lipolytica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas plantari*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas wisconsinensis*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Rhizomucor*, en particular *Rhizomucor miehei*, una cepa de *Rhizopus*, en particular *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus microsporus*, y *Rhizopus nodosus*, una cepa de *Rhodospiridium*, en particular *Rhodospiridium toruloides*, una cepa de *Rhodotorula*, en particular *Rhodotorula glutinis*, una cepa de *Sporobolomyces* en particular *Sporobolomyces shibatanus*, una cepa de *Thermomyces*, en particular *Thermomyces lanuginosus* (antes *Humicola lanuginosa*), una cepa de *Tiarosporella*, en particular *Thiarosporella phaseolina*, una cepa de *Trichoderma* en particular, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma reesei*, y/o una cepa de *Verticillium*.

[0082] En un aspecto preferido, la enzima lipolítica o el gen de la misma se obtiene de una cepa de *Aspergillus*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Chromobacter*, *Fusarium*, *Humicola*, *Hiphozyma*, *Pseudomonas*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, o *Thermomyces*

[0083] Los ejemplos preferidos de genes de lipasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Absidia* sp. (WO 97/027276), *Candida antártica* (Número de acceso EMBL Z30645), *Candida cylindracea* (Números de acceso EMBL X64703, X64704, X66006, X66007 y X66008), *Fusarium oxysporum* (WO 98/26057), *Penicillium camembertii* (Yamaguchi y col., 1991, Gene 103: 61-67) y *Thermomyces lanuginosus* (Número de acceso EMBL AF054513).

[0084] En otro aspecto preferido, al menos una esterasa es una cutinasa. Las cutinasas son enzimas que pueden degradar la cutina. La cutinasa o el gen de la misma se puede obtener de cualquier fuente. En un aspecto preferido, la cutinasa o el gen de la misma se obtiene de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae*, de una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, de una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambucium*, de una cepa de *Helminthosporium*, en particular *Helminthosporium sativum*, de una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola insolens*, de una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina* o *Pseudomonas putida*, de una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, de una cepa de *Streptomyces*, en particular *Streptomyces scabies*, o de una cepa de *Ulocladium*, en particular *Ulocladium consortiale*.

[0085] En un aspecto más preferido, la cutinasa o el gen de la misma se obtiene de una cepa de *Humicola insolens*, en particular *Humicola insolens* DSM 1800. La cutinasa de *Humicola insolens* se describe en WO 96/13580. El gen de la cutinasa puede codificar una variante como una de las variantes descritas en WO 00/34450 y WO 01/92502. Las variantes de cutinasa preferidas incluyen variantes enumeradas en el Ejemplo 2 de WO 01/92502. Una cantidad eficaz de cutinasa está entre 0,01 y 400 UL/g de MS, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 100 UL/g de MS, más preferiblemente, 1 a 50 UL/g de MS.

[0086] Los ejemplos preferidos de genes de cutinasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Fusarium solani* (WO 90/09446; patente de EE. UU. n.º 5,827,719; WO 00/34450; y WO 01/92502) y *Humicola insolens* (WO 96/13580), y sus variantes.

[0087] En otro aspecto preferido, al menos una esterasa es una fosfolipasa. Como se usa en el presente documento, el término "fosfolipasa" es una enzima que tiene actividad hacia los fosfolípidos. Los fosfolípidos, como la lecitina o la fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en una posición externa (sn-1) y media (sn-2) y esterificado con ácido fosfórico en la tercera posición. El ácido fosfórico, a su vez, puede esterificarse en un aminoalcohol. Se pueden distinguir varios tipos de actividad fosfolipasa, incluidas las fosfolipasas A₁ y A₂ que hidrolizan un grupo acilo graso (en la posición sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B), que hidroliza el grupo acilo graso restante para convertirlo en lisofosfolípido. La fosfolipasa C y la fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacilglicerol o ácido fosfatídico, respectivamente.

[0088] El término "fosfolipasa" incluye enzimas con actividad fosfolipasa, por ejemplo, actividad fosfolipasa A (A₁ o A₂), actividad fosfolipasa B, actividad fosfolipasa C o actividad fosfolipasa D. La actividad fosfolipasa puede ser proporcionada por enzimas que también tienen otras actividades, tales como, por ejemplo, una lipasa con actividad fosfolipasa. En otros aspectos de la invención, la actividad fosfolipasa es proporcionada por una enzima que tiene esencialmente solo actividad fosfolipasa y en donde la actividad la enzima fosfolipasa no es una actividad secundaria.

[0089] La fosfolipasa o el gen de la misma puede ser de cualquier origen, por ejemplo, de origen animal (por ejemplo, de un mamífero, como de páncreas bovino o porcino), o veneno de serpiente o veneno de abeja. Alternativamente, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo, de hongos filamentosos, levaduras o bacterias, como *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus oryzae*, *Dictyostelium*, por ejemplo, *Dictyostelium discoideum*; *Fusarium*, por ejemplo *Fusarium culmorum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, y *Fusarium venenatum*; *Mucor*, por ejemplo, *Mucor javanicus*, *Mucor mucedo*, y *Mucor subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo, *Neurospora crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo, *Rhizomucor pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus*, y *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia*, por ejemplo, *Sclerotinia libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo, *Trichophyton rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo, *Whetzelinia sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*; *Citrobacter*, por ejemplo, *Citrobacter freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*; *Edwardsiella*, *Edwardsiella tarda*; *Erwinia*, por ejemplo, *Erwinia herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae*; *Proteus*, por ejemplo, *Proteus vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo, *Providencia stuartii*; *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *Serratia liquefaciens* y *Serratia marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *Shigella flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces violeceoruber*, y *Yersinia*, por ejemplo, *Yersinia enterocolitica*. Las fosfolipasas comerciales preferidas incluyen LECITasa™ y LECITasa™ ULTRA (comercializadas por Novozymes A/S, Dinamarca).

[0090] Una cantidad eficaz de fosfolipasa está entre 0,01 y 400 UL/g de MS, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 100 UL/g de MS, más preferiblemente, de 1 a 50 UL/g de MS. Se puede obtener una optimización adicional de la cantidad de fosfolipasa usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

5 [0091] Los ensayos enzimáticos para fosfolipasas son ampliamente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kim y col., 1997, Anal. Biochem. 250: 109-116; Wu y Cho, 1994, Anal. Biochem. 221: 152-159; Hirashima y col., 1983, Brain and Nerve 35: 811-817; y Chen y col., 1997, Infection and Immun. 65: 405-411).

10 [0092] Los ejemplos preferidos de genes de fosfolipasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Fusarium venenatum* (WO 00/028044), *Aspergillus oryzae* (WO 01/029222), *Fusarium oxysporum* (WO 98/26057), *Penicillium notatum* (Masuda y col., 1991, European Journal of Biochemistry 202: 783-787), *Torulaspota delbrueckii* (Watanabe y col., 1994, FEMS Microbiology Letters 124: 29-34), *Saccharomyces cerevisiae* (Lee y col., 1994, Journal of Biological Chemistry 269: 19725-19730), *Aspergillus* (JP 10155493), *Neurospora crassa* (EMBL 042791) y *Schizosaccharomyces pombe* (EMBL 013857).

15 Proteasas

[0093] En otro aspecto preferido, una proteasa puede ser útil en la degradación de los polisacáridos de la pared celular vegetal en uno o más productos. La proteasa puede usarse, por ejemplo, para digerir proteínas para producir amino nitrógeno libre (FAN), donde dichos aminoácidos libres funcionan como nutrientes para la levadura, mejorando así el crecimiento de la levadura y, en consecuencia, la producción de etanol. Las proteasas también pueden liberar material de polisacárido unido.

25 [0094] La propagación de un microorganismo fermentador con una cantidad eficaz de al menos una proteasa puede reducir el tiempo de latencia del microorganismo fermentador. Se cree que la acción de la proteasa en el proceso de propagación da como resultado directa o indirectamente la supresión o expresión de genes que son perjudiciales o beneficiosos, respectivamente, para el microorganismo fermentador durante la fermentación, lo que disminuye el tiempo de latencia y da como resultado un ciclo de fermentación más rápido.

30 [0095] Las proteasas son ampliamente conocidas en la técnica y se refieren a enzimas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos. Las proteasas adecuadas incluyen proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas en condiciones ácidas por debajo de pH 7. Las proteasas fúngicas ácidas o sus genes se pueden obtener de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium*, y *Torulopsis*. En un aspecto preferido, una proteasa o gen de la misma se obtiene de

[0096] Preferiblemente, la proteasa es una proteasa de ácido aspártico, como se describe, por ejemplo, en Handbook of Proteolytic Enzymes, Edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Capítulo 270).

40 [0097] Los ensayos enzimáticos para proteasas ácidas, por ejemplo, las proteasas de ácido aspártico, son ampliamente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Litvinov y col., 1998, Bioorg. Khim 24: 175-178).

45 [0098] Los ejemplos preferidos de genes de proteasa ácida que pueden usarse en la invención se obtienen de *Aspergillus awamori* (Berka y col., 1990, Gene 86: 153-162), *Aspergillus niger* (Koaze y col., 1964, Agr. Biol. Chem Japón 28: 216), *Aspergillus saitoi* (Yoshida, 1954, J. Agr. Chem Soc. Japón 28: 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida y col., 1977, Agric. Biol. Chem 42: 927-933), *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044) y *Aspergillus oryzae* (Berka y col., 1993, Gene 125: 195-198).

50 Peroxidasas

[0099] Una peroxidasa puede ser cualquier peroxidasa (por ejemplo, EC 1.11.1.7), o cualquier fragmento obtenido a partir de la misma, que tenga actividad peroxidasa.

55 [0100] La peroxidasa o el gen de la misma se puede obtener de plantas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o de soja) o microorganismos (por ejemplo, hongos o bacterias).

60 [0101] Algunos hongos preferidos incluyen cepas que pertenecen a la subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Hyphomycetes*, por ejemplo, *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Verticillum*, *Arthromyces*, *Caldariomyces*, *Ulocladium*, *Embellisia*, *Cladosporium* o *Dreschlera*, en particular *Fusarium oxysporum* (DSM 2672), *Humicola insolens*, *Trichoderma reesei*, *Myrothecium verrucaria* (IFO 6113) *Verticillum alboatrum*, *Verticillum dahlie*, *Arthromyces ramosus* (FERM P-7754) *Caldariomyces fumago*, *Ulocladium chartarum*, *Embellisia alli*, y *Dreschlera halodes*.

65 [0102] Otros hongos preferidos incluyen cepas que pertenecen a la subdivisión *Basidiomycotina*, clase *Basidiomycetes*, por ejemplo, *Coprinus*, *Phanerochaete*, *Coriolus* o *Trametes*, en particular *Coprinus cinereus* f.

microsporus (IFO 8371) *Coprinus macrorhizus*, *Phanerochaete chrysosporium* (por ejemplo NA-12), o *Trametes* (anteriormente llamado *Polyporus*), por ejemplo, *T. versicolor* (por ejemplo PR4 28-A).

5 [0103] Otros hongos preferidos incluyen cepas que pertenecen a la subdivisión *Zygomycotina*, clase *Mycoraceae*, por ejemplo, *Rhizopus* o *Mucor*, en particular *Mucor hiemalis*.

10 [0104] Algunas bacterias preferidas incluyen cepas del orden *Actinomycetales*, por ejemplo *Streptomyces spheroides* (ATCC 23965), *Streptomyces thermoviolaceus* (IFO 12382), y *Streptoverticillum verticillium* ssp. *verticillium*.

[0105] Otras bacterias preferidas incluyen cepas de *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodomonas palustri*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas purrocina* (ATCC 15958), *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-11), y *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus pumilus* (ATCC 12905) y *Bacillus stearothermophilus*.

15 [0106] Otras bacterias preferidas incluyen cepas que pertenecen a las *Myxococcus*, por ejemplo, *M. virescens*.

[0107] En un aspecto preferido, un gen que codifica una peroxidasa se obtiene de una *Coprinus* sp., en particular, *Coprinus macrorhizus* o *Coprinus cinereus* según WO 92/16634.

20 [0108] En la presente invención, los genes que codifican una peroxidasa incluyen peroxidasas y fragmentos activos de peroxidasa obtenidos de citocromos, hemoglobina o enzimas peroxidasa.

25 [0109] Una unidad de peroxidasa (POXU) es la cantidad de enzima que, en las siguientes condiciones, cataliza la conversión de 1 μmol de peróxido de hidrógeno por minuto: tampón fosfato 0,1 M pH 7,0, 0,88 mM de peróxido de hidrógeno y 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) 1,67 mM a 30 °C. La reacción es seguida durante 60 segundos (15 segundos después de la mezcla) por el cambio en la absorbancia a 418 nm, que debe estar en el intervalo de 0,15 a 0,30. Para el cálculo de la actividad se utiliza un coeficiente de absorción de ABTS oxidado de 36 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y una estequiometría de un μmol de H_2O_2 convertido por dos μmoles de ABTS oxidado.

30 [0110] Los ejemplos preferidos de genes de peroxidasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Bjerkandera adusta* (WO 2001/098469), *Ceriporiopsis subvermispota* (Conesa y col., 2002, Journal of Biotechnology 93: 143-158), *Coprinus cinereus* (Conesa y col. 2002, supra), *Phanerochaete chrysosporium* (Conesa y col. 2002, supra), *Phlebia radiata* (Conesa y col. 2002, supra), *Pleurotus eryngii* (Conesa y col. 2002, supra), y *Trametes versicolor* (Conesa y col. 2002, supra).

35 Lacasas

[0111] En la presente invención, la lacasa puede ser cualquier lacasa o enzima relacionada con la lacasa incluyendo cualquier lacasa (EC 1.10.3.2), cualquier catecol oxidasa (EC 1.10.3.1), cualquier bilirrubina oxidasa (EC 1.3.3.5) o cualquier monofenol monooxigenasa (EC 1.14.18.1).

[0112] Las enzimas o genes mencionados anteriormente pueden obtenerse de un microorganismo, a saber, bacterias u hongos (incluidos hongos filamentosos y levaduras), o pueden obtenerse de plantas.

45 [0113] Las fuentes fúngicas adecuadas incluyen *Aspergillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *Neurospora crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por ejemplo, *Trametes villosa* y *Trametes versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *Rhizoctonia solani*, *Coprinus*, por ejemplo, *Coprinus cinereus*, *Coprinus comatus*, *Coprinus friesii*, y *Coprinus plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *Psathyrella condelleana*, *Panaeolus*, por ejemplo, *Panaeolus papilionaceus*, *Myceliophthora*, por ejemplo, *Myceliophthora thermophila*, *Scytalidium*, por ejemplo, *Scytalidium thermophilum*, *Polyporus*, por ejemplo, *Polyporus pinsitus*, *Pycnoporus*, por ejemplo, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phlebia*, por ejemplo *Phlebia radiata* (WO 92/01046) o *Coriolus*, por ejemplo, *Coriolus hirsutus* (JP 2-238885). Los *Bacillus* son fuentes de bacterias adecuadas.

55 [0114] Una lacasa o un gen de la misma se obtiene preferiblemente de *Coprinus*, *Myceliophthora*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Scytalidium* o *Rhizoctonia*; en particular *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Polyporus pinsitus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Scytalidium thermophilum*, o *Rhizoctonia solani*.

60 [0115] La actividad lacasa (LACU) se determina a partir de la oxidación de siringaldazina en condiciones aeróbicas. El color violeta producido se mide por fotometría a 530 nm. Las condiciones analíticas son 19 mM de siringaldazina, 23 mM de tampón de acetato, pH 5,5, 30 °C, tiempo de reacción de 1 minuto. Una unidad de lacasa (LACU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0 μmoles de siringaldazina por minuto en estas condiciones.

65 [0116] La actividad lacasa (LAMU) se determina a partir de la oxidación de siringaldazina en condiciones aeróbicas. El color violeta producido se mide por fotometría en 530 nm. Las condiciones analíticas son 19 mM de siringaldazina, 23 mM de Tris/maleato, pH 7,5, 30 °C, tiempo de reacción de 1 minuto. Una unidad de lacasa

(LAMU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0 μ mol de siringaldazina por minuto en estas condiciones.

[0117] Los ejemplos preferidos de genes de lacasa que pueden usarse en la invención se obtienen de *Cantharellus cibarius* (Ng y col., 2004, Biochemical and Biophysical Research Communications 313: 37-41), *Coprinus cinereus* (WO 97/008325), *Lentinula edodes* (Nagai y col., 2002, Applied Microbiology and Biotechnology 60: 327-335, 2002), *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen y col., 2004, FEBS Letters 576: 251-255, 2004), *Myceliophthora thermophila* (WO 95/006815), *Polyporus pinsitus* (WO 96/000290), *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia y col., 2004, Journal of Molecular Biology 342: 1519-1531), *Rhizoctonia solani* (WO 96/007988), *Scytalidium thermophilum* (WO 95/033837) y *Tricholoma giganteum* (Wang y col., 2004, Biochemical and Biophysical Research Communications 315: 450-454).

Construcciones de ácido nucleico

[0118] Un gen aislado que codifica una enzima degradadora o convertidora de polisacáridos de la pared celular vegetal, por ejemplo, una enzima que degrada la celulosa, la hemicelulasa, la esterasa, la lacasa, la ligninasa, la proteasa o la peroxidasa, puede manipularse de varias maneras para que exprese la enzima. La manipulación del gen antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos que utilizan técnicas de ADN recombinante son ampliamente conocidas en la técnica.

[0119] El término "construcción de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico, monocatenaria o bicatenaria, que se aísla de un gen natural o que se ha modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existe de forma natural. El término construcción de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando la construcción de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0120] El término "secuencias de control" se define en el presente documento de modo que incluye todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido que tiene una actividad enzimática de interés. Cada secuencia de control puede ser nativa o exógena respecto de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a: líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0121] El término "operativamente unido" como se usa en el presente documento se refiere a una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de la secuencia de ADN de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polipéptido.

[0122] Cuando se usa en el presente documento, el término "secuencia codificante" está destinado a cubrir una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteico. Los límites de la secuencia de codificación generalmente están determinados por un marco de lectura abierta, que generalmente comienza con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos como GTG y TTG. La secuencia de codificación típicamente incluye ADN, ADNc y secuencias de nucleótidos recombinantes.

[0123] El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0124] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora adecuada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por un huésped para la expresión del gen. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcional que actúan como mediadoras en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en el huésped de elección, incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos al huésped.

[0125] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*gluA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*,

celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0126] En el caso de la degradación o conversión de los polisacáridos de la pared celular vegetal, la elección del promotor requiere necesariamente su inducción por el crecimiento del huésped en la biomasa del polisacárido.

[0127] La secuencia de control también puede ser una secuencia de terminación de la transcripción adecuada, una secuencia reconocida por un huésped para terminar la transcripción. La secuencia de terminación está operativamente unida al extremo 3' del gen que codifica una enzima. Cualquier terminador que sea funcional en el huésped elegido puede usarse en la presente invención.

[0128] Los terminadores preferidos para huéspedes fúngicos filamentosos se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, CBHI de *Trichoderma reesei*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, y proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0129] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte del huésped. La secuencia líder está operativamente vinculada al extremo 5' de un gen. Cualquier secuencia líder que sea funcional en el huésped de elección puede usarse en la presente invención.

[0130] Los líderes preferidos para células huésped de hongos filamentosos se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0131] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' de un gen y que, cuando se transcribe, es reconocida por el huésped como una señal para agregar residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en el huésped elegido puede usarse en la presente invención.

[0132] Las secuencias de poliadenilación preferidas para huéspedes fúngicos filamentosos se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0133] La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos unida al extremo amino de una enzima y dirige la enzima codificada hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del gen puede contener inherentemente una región codificante de péptido señal unida de forma natural en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido secretado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante de péptido señal que es exógena a la secuencia codificante. La región codificante de péptido señal exógena puede ser requerida cuando la secuencia codificante no contiene de forma natural una región codificante de péptido señal. Alternativamente, la región codificante de péptido señal exógena puede simplemente reemplazar la región codificante de péptido señal natural para mejorar la secreción de la enzima. Sin embargo, cualquier región codificante del péptido señal que dirige el polipéptido expresado hacia la ruta secretora de una célula huésped de elección, es decir, secretada en un medio de cultivo, puede usarse en la presente invención.

[0134] Las regiones codificantes de péptido señal eficaces para huéspedes fúngicos filamentosos son las regiones codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, CBHI de *Trichoderma reesei*, CBHII de *Trichoderma reesei*, EGI de *Trichoderma reesei* y CBHIII de *Trichoderma reesei*.

[0135] La secuencia de control también puede ser una región codificante de propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el extremo amino terminal de una enzima. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o polipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente está inactivo y se puede convertir en una enzima activa madura mediante la escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del polipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener de genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0136] Cuando tanto el péptido señal como las regiones del propéptido están presentes en el extremo amino terminal de una enzima, la región del propéptido se coloca al lado del extremo amino terminal de la enzima y la región del péptido señal se coloca al lado del extremo amino terminal de la región del propéptido.

[0137] También puede ser deseable agregar secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de una enzima en relación con el crecimiento del huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión de un gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. En las levaduras, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En los hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden usarse como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación de genes. En los sistemas eucariotas, estos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el gen estaría operativamente unido a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0138] Los diversos ácidos nucleicos y secuencias de control descritos anteriormente pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de un gen en dichos sitios. Alternativamente, un gen puede expresarse insertando la secuencia de nucleótidos o una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia de codificación se ubica en el vector de modo que la secuencia de codificación se une operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0139] El término "vector de expresión" abarca una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica una enzima, y que está operativamente unido a segmentos adicionales que permiten su transcripción.

[0140] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que puede provocar la expresión de un gen de interés. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con el huésped en el que se va a introducir el vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

[0141] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en el huésped, 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 solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que, juntos, contienen el ADN total para introducir en el genoma del huésped, o un transposón.

[0142] Los vectores contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de huéspedes transformados. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o virales, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

[0143] Los marcadores seleccionables para su uso en un huésped fúngico filamentosos incluyen, entre otros, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato de adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como sus equivalentes. Los preferidos para el uso en *Aspergillus* son los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. Los preferidos para el uso en *Trichoderma* son *bar* y *amdS*.

[0144] Los vectores contienen preferiblemente un elemento o elementos que permite(n) la integración del vector en el genoma del huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0145] Para la integración en el genoma del huésped, el vector puede basarse en la secuencia del gen o en cualquier otro elemento del vector para la integración del vector en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma del huésped. Las secuencias de nucleótidos adicionales permiten que el vector se integre en el genoma del huésped en una o varias ubicaciones precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10 000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10 000 pares de bases, y de la manera más preferible de 800 a 10 000 pares de bases, que son altamente homólogos con la secuencia receptora correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia receptora en el genoma del huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma del huésped mediante recombinación no homóloga.

[0146] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique de forma autónoma en el huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que actúe como mediador en la replicación autónoma que tiene lugar en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plasmídico" se define aquí como una secuencia que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*. Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems y col., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen y col., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en WO 00/24883.

[0147] En la célula huésped se puede insertar más de una copia de la secuencia de ácido nucleico de la presente invención para aumentar la producción del producto génico. Se puede obtener un incremento del número de copias del polinucleótido mediante integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma del huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con la secuencia de nucleótidos, donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por consiguiente, copias adicionales del gen, se pueden seleccionar mediante cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0148] Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son ampliamente conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col. 1989, *supra*).

Preparación del caldo de fermentación completo usado

[0149] En los métodos de la presente invención, la preparación de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo recombinante puede lograrse usando cualquier método de cultivo conocido en la técnica que dé como resultado la expresión de una enzima de degradación o conversión de polisacáridos de la pared celular vegetal. Por lo tanto, se puede entender que la fermentación comprende el cultivo en matraces con agitación, fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, discontinua alimentada o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizadas en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión o el aislamiento de celulasa. El término "caldo de fermentación completo usado" se define en este documento como contenidos no fraccionados de material de fermentación que incluye medio de cultivo, proteínas extracelulares (por ejemplo, enzimas) y biomasa celular. Se entiende que el término "caldo de fermentación completo usado" también abarca la biomasa celular que se ha lisado o permeabilizado utilizando métodos conocidos en la técnica.

[0150] Generalmente, el microorganismo recombinante se cultiva en un medio nutritivo adecuado para la producción de enzimas que tienen actividad de degradación o de conversión de la pared celular vegetal. El cultivo se lleva a cabo en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados se pueden obtener de proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Los rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de celulasa son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bailey, J.E. y Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

[0151] Las enzimas pueden detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos, por ejemplo, como se ha descrito antes.

[0152] En los métodos de la presente invención, el caldo de fermentación completo usado se usa preferiblemente "sin alterar" sin ningún procesamiento o tratamiento mínimo tal como refrigeración para preservar la actividad, tratamiento térmico para evitar o disminuir la viabilidad del organismo o adición de agentes químicos que impidan o disminuyan la viabilidad del organismo.

[0153] La actividad de degradación de la celulosa del caldo de fermentación completo usado puede determinarse usando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. La hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) disminuye la viscosidad de la mezcla de ensayo, que puede determinarse mediante un viscosímetro de vibración (por ejemplo, MIVI 3000 de Sofraser, Francia). La determinación de la actividad degradadora de la celulosa, medida en términos de Unidad de Viscosidad de la Celulosa (CEVU, por sus siglas en inglés), cuantifica la cantidad de actividad catalítica presente en el caldo de fermentación completo usado midiendo la capacidad de la muestra para reducir la viscosidad de una solución de carboximetilcelulosa (CMC). El ensayo se lleva a cabo a 40 °C; pH 9.0; Tampón fosfato 0,1 M; tiempo 30 minutos; Sustrato de CMC (33,3 g/L de carboximetilcelulosa Hercules 7 LFD); concentración enzimática aprox. 3,3-4,2 CEVU/ml. La actividad de CEVU se calcula en relación con un estándar enzimático, como el Estándar 17-1194 de Celluzyme™ (obtenido de Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca).

[0154] Se pueden medir otras actividades enzimáticas como se describe en el presente documento.

Suplementos

[0155] En los métodos de la presente invención, el caldo de fermentación completo usado puede complementarse con una o más actividades enzimáticas no expresadas por el microorganismo recombinante para mejorar la degradación o conversión de los polisacáridos de la pared celular vegetal.

5 [0156] Las enzimas adicionales preferidas incluyen, pero no se limitan a, endoglucanasa (celulasa), celobiohidrolasa, beta-glucosidasa, endo-beta-1,3(4)-glucanasa, glucohidrolasa, xiloglucanasa, xilanasa, xilosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, alfa-glucuronidasa, acetilxilano esterasa, mananasa, manosidasa, alfa-galactosidasa, manano acetil esterasa, galactanasa, arabinanasa, pectato liasa, pectín liasa, pectato liasa, poligalacturonasa, pectín acetil esterasa, pectín metil esterasa, alfa-arabinofuranosidasa, beta-galactosidasa, galactanasa, arabinanasa, alfa-arabinofuranosidasa, ramnogalacturonasa, ramnogalacturonano liasa, ramnogalacturonano acetil esterasa, xilogalacturonosidasa, xilogalacturonasa, ramnogalacturonano liasa, lignina peroxidasa, peroxidasa dependientes del manganeso, peroxidasa híbridas, con propiedades combinadas de lignina peroxidasa y peroxidasa dependientes del manganeso, y lacasa.

15 [0157] Las enzimas pueden obtenerse de una fuente microbiana o vegetal adecuada o por medios recombinantes como se describe en el presente documento o pueden obtenerse de fuentes comerciales.

[0158] La(s) enzima(s) adicional(es) agregada(s) como suplemento al caldo completo usado pueden usarse "sin alterar" o pueden purificarse. El término "sin alterar", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación enzimática producida por fermentación que experimenta una recuperación y/o purificación mínima o nula. El término "purificado/a", como se usa en el presente documento, cubre enzimas libres de otros componentes del organismo del que se obtiene. El término "purificado/a" también abarca enzimas libres de componentes del organismo nativo del que se obtiene. Las enzimas pueden purificarse, con solo pequeñas cantidades de otras proteínas presentes. El término "purificado/a" como se usa en el presente documento también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente otras proteínas y más particularmente otras enzimas presentes en la célula de origen de la enzima. La enzima puede ser "sustancialmente pura", es decir, estar libre de otros componentes del organismo en el que se produce, es decir, por ejemplo, un organismo huésped para enzimas producidas por medios recombinantes. En el aspecto preferido, las enzimas son al menos 20 % puras, preferiblemente al menos 40 % puras, más preferiblemente al menos 60 % puras, más preferiblemente al menos 80 % puras, incluso más preferiblemente al menos 90 % puras, de la manera más preferible al menos 95 % puras, y aún más preferiblemente al menos 99 % puras, según lo determinado por SDS-PAGE.

[0159] Cuando la enzima(s) se obtiene(n) de una fuente microbiana o vegetal adecuada o por medios recombinantes, la enzima se puede recuperar utilizando métodos de recuperación conocidos en la técnica. Por ejemplo, la enzima puede recuperarse de un medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0160] La(s) enzima(s) puede(n) purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, por afinidad, hidrofóbica, de cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos de electroforesis (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

45 [0161] Las enzimas también se pueden obtener de fuentes comerciales.

[0162] Los ejemplos de celulasas adecuadas para uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLUCLAST™ (comercializada por Novozymes A/S), NOVOZYM™ 188 (comercializada por Novozymes A/S). Otras preparaciones disponibles en el mercado que comprenden celulasa que pueden usarse incluyen CELLUZYME™, CEREFLO™ y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAMINEX™ y SPEZYME™ CP (Genencor Int.) Y ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH). Las enzimas celulasa se agregan en cantidades eficaces de aproximadamente 0,001 a 5,0 % en peso de sólidos, más preferiblemente de aproximadamente 0,025 % a 4,0 % en peso de sólidos y, de la manera más preferible, de aproximadamente 0,005 % a 2,0 % en peso de sólidos.

55 [0163] Las preparaciones comercializadas preferidas que comprenden xilanasa incluyen SHEARZYME®, BIOFEED WHEAT®, BIO-FEED Plus® L, CELLUCLAST®, ULTRAFLO®, VISCOZYME®, PENTOPAN MONO® BG, PULPZYME® HC (Novozymes A/S); LAMINEX®, SPEZYME® CP (Genencor Int.). La hemicelulasa se agrega preferiblemente en una cantidad eficaz de aproximadamente 0,001 a 5,0 % en peso de sólidos, más preferiblemente de aproximadamente 0,025 a 4,0 % en peso de sólidos, y de la manera más preferible de aproximadamente 0,005 a 2,0 % en peso de sólidos.

[0164] Una preparación preferida comercialmente disponible que comprende hemicelulasa incluye VISCOZYME™ (Novozymes A/S). Las enzimas hemicelulasa se agregan en cantidades eficaces de aproximadamente 0,001 a 5,0 % en peso de sólidos, más preferiblemente de aproximadamente 0,025 % a 4,0 % en peso de sólidos, y de la manera más preferible de aproximadamente 0,005 % a 2,0 % en peso de sólidos.

[0165] Las lipasas comerciales preferidas incluyen LECITasa™, LIPOLasa™ y LIPEX™ (Novozymes A/S, Dinamarca) y G AMANO™ 50 (Amano). Las lipasas se añaden o presentan preferiblemente en cantidades de aproximadamente 1 a 400 UL/g de MS, preferiblemente de 1 a 10 UL/g de MS, y más preferiblemente de 1 a 5 UL/g de MS.

[0166] Las fosfolipasas comerciales preferidas incluyen LECITasa™ y LECITasa™ ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca).

[0167] Las proteasas comerciales preferidas incluyen ALCALasa™, SAVINasa™ y NEUTRasa™ (Novozymes A/S), GC106 (Genencor Int, Inc.) y NOVOZYM™ 50006 (Novozymes A/S).

[0168] La(s) enzima(s) adicional(es) utilizada(s) en la presente invención puede(n) estar en cualquier forma adecuada para su uso en los procesos descritos en este documento, tales como, por ejemplo, en forma de polvo seco o granulado, un granulado sin dispersión de partículas, un líquido, un líquido estabilizado o una enzima protegida. Se pueden producir granulados, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE. UU. 4,106,991 y 4,661,452, y opcionalmente pueden recubrirse mediante un proceso conocido en la técnica. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse mediante la adición de estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, ácido láctico u otro ácido orgánico de acuerdo con el proceso establecido. Las enzimas protegidas pueden prepararse de acuerdo con el proceso descrito en la EP 238,216.

Procesamiento de polisacáridos de la pared celular vegetal

[0169] Los métodos de la presente invención pueden usarse en la producción de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como materias primas químicas o de fermentación a partir de biomasa para la producción de productos orgánicos, productos químicos y combustibles, plásticos y otros productos o intermedios. En particular, el valor de los residuos de procesamiento (residuos de destilería desecados, bagazo de la elaboración de la cerveza, bagazo de caña de azúcar, etc.) puede aumentarse mediante la solubilización parcial o completa de celulosa o hemicelulosa. Además del etanol, algunos productos químicos básicos y especializados que se pueden producir a partir de celulosa y hemicelulosa incluyen xilosa, acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido láctico), 1,3-propanodiol, butanodiol, glicerol, etilenglicol, furfural, polihidroxialcanoatos, *cis*, ácido *cis*-mucónico y pienso para animales (Lynd, L. R., Wyman, C. E. y Gerngross, T. U., 1999, Biocommodity engineering, *Biotechnol. Prog.* 15: 777-793; Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, en *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; y Ryu, D. D. Y., y Mandels, M., 1980, Cellulases: biosynthesis and applications, *Enz. Microb. Technol.*, 2: 91-102). Los beneficios potenciales de la coproducción se extienden más allá de la síntesis de múltiples productos orgánicos a partir de carbohidratos fermentables. Los residuos ricos en lignina que quedan después del procesamiento biológico de un polisacárido de la pared celular vegetal pueden convertirse en productos químicos obtenidos con lignina o usarse para la producción de energía (Lynd y *col.* 1999, *supra*; Philippidis, 1996, *supra*; Ryu y Mandels, 1980, *supra*).

[0170] Los expertos en la técnica conocen bien los métodos convencionales utilizados para procesar los polisacáridos de la pared celular vegetal de acuerdo con los métodos de la presente invención. Los métodos de la presente invención pueden implementarse usando cualquier aparato convencional de procesamiento de biomasa configurado para funcionar según la invención.

[0171] Tal aparato puede incluir, pero no se limita a, un reactor agitado discontinuo, un reactor agitado de flujo continuo con ultrafiltración, un reactor de columna de flujo de tapón continuo (Gusakov, A. V., y Sinitsyn, A. P., 1985, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, *Enz. Microb. Technol.*, 7: 346-352), un reactor de abrasión por agitación (Ryu, S. K. y Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 25: 53-65), o un reactor con agitación intensiva inducida por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 56: 141-153).

[0172] Los métodos convencionales incluyen, entre otros, sacarificación, fermentación, hidrólisis y fermentación separadas (SHF), sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), sacarificación y cofermentación simultáneas (SSCF), hidrólisis y fermentación híbridas (HHF) y conversión microbiana directa (DMC).

[0173] La SHF usa pasos de proceso separados para hidrolizar enzimáticamente primero la celulosa en glucosa y luego fermentar la glucosa en etanol. En la SSF, la hidrólisis enzimática de celulosa y la fermentación de glucosa a etanol se combinan en un solo paso (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). La SSCF incluye la cofermentación de múltiples azúcares (Sheehan, J. y Himmel, M., 1999, *Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol*, *Biotechnol. Prog.*, 15: 817-827). El proceso de hidrólisis y fermentación híbridas (HHF) incluye dos pasos separados realizados en el mismo reactor pero a diferentes temperaturas, sacarificación enzimática a alta

temperatura seguida de SSF a una temperatura más baja que la cepa de fermentación puede tolerar. La DMC combina los tres procesos (producción de celulasa, hidrólisis de celulosa y fermentación) en un solo paso (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. y Pretorius, I. S., 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, Microbiol. Mol. Biol. Reviews, 66: 506-577).

5 [0174] "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprenda un paso de fermentación. Un proceso de fermentación incluye, sin limitación, procesos de fermentación utilizados para producir productos de fermentación que incluyen alcoholes (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol y xilitol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxiopropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina y treonina); y/o gases (por ejemplo, metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂) y monóxido de carbono (CO)).
10
15 Los procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación utilizados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco.

20 [0175] La presente invención también se refiere a métodos para producir una o más sustancias orgánicas, que comprenden: (a) la sacarificación de polisacáridos de la pared celular vegetal con una cantidad eficaz de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo recombinante, en el que el microorganismo recombinante expresa uno o más genes heterólogos que codifican enzimas que degradan o convierten los polisacáridos de la pared celular vegetal en material sacarificado; (b) fermentación del material sacarificado del paso (a) con uno o más microorganismos de fermentación; y (c) recuperación de la o las sustancias orgánicas de la fermentación.

25 [0176] La sustancia orgánica puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. En un aspecto preferido, la sustancia orgánica es un alcohol. Se entenderá que el término "alcohol" abarca una sustancia orgánica que contiene uno o más restos hidroxilo. En un aspecto más preferido, el alcohol es arabinitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es butanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es etanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es glicerol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es metanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es 1,3-propanodiol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es sorbitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es xilitol. véase, por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Silveira, M. M., y Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 400-408; Nigam, P., y Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, Process Biochemistry 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. y Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by Clostridium beijerinckii BA101 and in situ recovery by gas stripping, World Journal of Microbiology and Biotechnology 19 (6): 595-603.

40 [0177] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es un ácido orgánico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acético. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido adípico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido ascórbico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido cítrico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido 2,5-diceto-D-glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fórmico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fumárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucurónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glutárico. En otro aspecto preferido, el ácido orgánico es ácido 3-hidroxiopropiónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido itacónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido láctico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es el ácido málico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es el ácido malónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido oxálico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido propiónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido succínico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido xilónico. véase, por ejemplo, Chen, R. y Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65: 435-448.

55 [0178] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es una cetona. Se entenderá que el término "cetona" abarca una sustancia orgánica que contiene uno o más restos de cetona. En otro aspecto más preferido, la cetona es acetona. Véase, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, *supra*.

60 [0179] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es un aldehído. En otro aspecto más preferido, el aldehído es un furfural.

[0180] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es un aminoácido. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido aspártico. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es alanina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es arginina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es asparagina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es glutamina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es ácido glutámico. En

otro aspecto más preferido, el aminoácido es glicina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es histidina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es isoleucina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es leucina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es lisina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es metionina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es fenilalanina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es prolina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es serina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es treonina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es triptófano. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es tirosina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es valina. véase, por ejemplo, Richard, A. y Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 501-515.

[0181] En otro aspecto preferido, la sustancia orgánica es un gas. En otro aspecto más preferido, el gas es metano (CH₄). En otro aspecto más preferido, el gas es hidrógeno (H₂). En otro aspecto más preferido, el gas es dióxido de carbono (CO₂). En otro aspecto más preferido, el gas es monóxido de carbono (CO). Véase, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya y K. Kiriya, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Science and Technology* 36 (6-7): 41-47; y Gunaseelan V.N. in *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.

[0182] La producción de una sustancia orgánica a partir de polisacáridos, como la celulosa, generalmente requiere cuatro pasos principales. Estos cuatro pasos son pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación. A continuación se ejemplifica un proceso para producir etanol, pero se entenderá que se pueden usar procesos similares para producir otras sustancias orgánicas, por ejemplo, las sustancias descritas anteriormente.

[0183] Pretratamiento En el paso de pretratamiento o prehidrólisis, el material celulósico se calienta para descomponer la estructura de lignina y carbohidrato para hacer que la fracción de celulosa sea accesible para las enzimas celolíticas. El calentamiento se realiza directamente con vapor o en suspensión, donde también se puede agregar un catalizador al material para acelerar las reacciones. Los catalizadores incluyen ácidos fuertes, como ácido sulfúrico y SO₂ o álcali, como el hidróxido de sodio. El propósito del paso de pretratamiento es facilitar la penetración de las enzimas y microorganismos. La biomasa celulósica también se puede someter a un pretratamiento hidrotérmico por explosión de vapor (véase la solicitud de patente de EE. UU. n.º 20020164730).

[0184] Sacarificación. En el paso de hidrólisis enzimática, también conocida como sacarificación, las enzimas descritas en el presente documento se agregan al material pretratado para convertir la fracción de celulosa en glucosa y/u otros azúcares. La sacarificación se realiza generalmente en reactores de tanque con agitación o fermentadores en condiciones controladas de pH, temperatura y mezcla. Un paso de sacarificación puede durar hasta 200 horas. La sacarificación se puede llevar a cabo a temperaturas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 65 °C, en particular a aproximadamente 50 °C, y a un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, especialmente alrededor de pH 4,5. Para producir glucosa que pueda ser metabolizada por la levadura, la hidrólisis se realiza típicamente en presencia de una beta-glucosidasa.

[0185] Fermentación. En el paso de fermentación, los azúcares, liberados de los polisacáridos de la pared celular vegetal como resultado del pretratamiento y los pasos de hidrólisis enzimática, se fermentan en una o más sustancias orgánicas, por ejemplo, etanol, por un organismo fermentador, como la levadura, u organismos fermentadores. La fermentación también puede realizarse simultáneamente con la hidrólisis enzimática en los mismos recipientes, nuevamente en condiciones controladas de pH, temperatura y mezcla. Cuando la sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente en el mismo recipiente, el proceso generalmente se denomina sacarificación y fermentación simultáneas o SSF.

[0186] Cualquier biomasa de la pared celular vegetal adecuada puede usarse en un proceso de fermentación de la presente invención. La biomasa de la pared celular vegetal se selecciona generalmente en función del producto o productos de fermentación deseados y el proceso empleado, como es ampliamente conocido en la técnica. Los ejemplos de sustratos adecuados para usar en los métodos de la presente invención incluyen materiales que contienen celulosa, tales como residuos de madera o plantas o azúcares de bajo peso molecular DP₁₋₃ obtenidos a partir de polisacáridos procesados de la pared celular vegetal que pueden ser metabolizados por el microorganismo fermentador, y que pueden ser suministrados por adición directa a los medios de fermentación.

[0187] Se entenderá que el término "medio de fermentación" se refiere a un medio antes de que se agreguen los microorganismos de fermentación, como un medio resultante de un proceso de sacarificación, así como un medio utilizado en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

[0188] "Microorganismo fermentador" se refiere a cualquier microorganismo adecuado para su uso en un proceso de fermentación deseado. Los microorganismos fermentadores adecuados según la invención pueden fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa u oligosacáridos, directa o indirectamente en los productos de fermentación deseados. Los ejemplos de microorganismos en fermentación incluyen organismos fúngicos, como la levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., y

en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, Red Star®/Lesaffre Ethanol Red (comercializada por Red Star/Lesaffre, EE. UU.) FALI (comercializada por Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EE. UU.), SUPERSTART (comercializada por Alltech), GERT STRAND (comercializada por Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (comercializada por DSM Specialties).

También se pueden usar otros microorganismos dependiendo del producto o productos de fermentación deseados. Estos otros microorganismos incluyen bacterias grampositivas, por ejemplo, *Lactobacillus* como *Lactobacillus lactis*, *Propionibacterium freudenreichii*; *Clostridium* sp. como *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium diolis*, *Clostridium acetobutylicum*, y *Clostridium thermocellum*; bacterias gramnegativas, por ejemplo, *Zymomonas* como *Zymomonas mobilis*; y hongos filamentosos, por ejemplo, *Rhizopus oryzae*.

[0189] En un aspecto preferido, la levadura es una especie de *Saccharomyces*. En un aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces distaticus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces uvarum*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Kluyveromyces*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida pseudotropicalis*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida brassicae*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Clavispora*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora lusitaniae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora opuntiae*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Pachysolen*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Pachysolen tannophilus*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Bretannomyces*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

[0190] Las bacterias que pueden fermentar eficientemente glucosa en etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, *supra*).

[0191] Es bien sabido en la técnica que los organismos descritos anteriormente también pueden usarse para producir otras sustancias orgánicas, como se describe en el presente documento.

[0192] La clonación de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* (Chen, Z., Ho, N. W. Y., 1993, Cloning and improving the expression of *Pichia stipitis* xylose reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Biochem. Biotechnol., 39-40: 135-147; Ho, N. W. Y., Chen, Z., Brainard, A. P., 1998, Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effectively cofermenting glucose and xylose, Appl. Environ. Microbiol. 64: 1852-1859), o en bacterias como *Escherichia coli* (Beall, D. S., Ohta, K., Ingram, L. O., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*, Biotech. Bioeng. 38: 296-303), *Klebsiella oxytoca* (Ingram, L. O., Gomes, P. F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P., York, S. W., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng., 58: 204-214) y *Zymomonas mobilis* (Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., y Picataggio, S., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*, Science, 267: 240-243; Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C. y Picataggio, S., 1996, Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering, Appl. Environ. Microbiol., 62: 4465-4470) ha llevado a la construcción de organismos capaces de convertir hexosas y pentosas en etanol (cofermentación).

[0193] La levadura u otros microorganismos se agregan típicamente al hidrolizado y se permite que la fermentación continúe durante 24-96 horas, tal como 35-60 horas. La temperatura está típicamente entre 26-40 °C, en particular a aproximadamente 32 °C, y a un pH 3-6, en particular a aproximadamente pH 4-5.

[0194] En un aspecto preferido, la levadura se aplica al hidrolizado y la fermentación continúa durante 24-96 horas, tal como típicamente 35-60 horas. En otro aspecto preferido, la temperatura es generalmente de entre 26-40 °C, en particular aproximadamente 32 °C, y el pH es generalmente de pH 3 a 6, preferiblemente aproximadamente pH 4-5. Las células de levadura se aplican preferiblemente en cantidades de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , especialmente 5×10^7 recuento de levadura viable por ml de caldo de fermentación. Durante la fase de producción de etanol, el recuento de células de levadura debe estar preferiblemente en el rango de 10^7 a 10^{10} , especialmente alrededor de 2×10^8 . Se puede encontrar más indicaciones sobre el uso de levadura para la fermentación en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons y D.R. Kelelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999).

[0195] El proceso más utilizado en la técnica es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) en el que no hay un paso de retención para la sacarificación, lo que significa que el microorganismo fermentador y la enzima se añaden juntos.

[0196] Para la producción de etanol, después de la fermentación, la pulpa se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido de acuerdo con el proceso de la invención puede usarse como, por ejemplo, etanol combustible; etanol para el consumo en bebidas, es decir, bebidas alcohólicas neutras potables, o etanol industrial.

[0197] Se puede usar un estimulador de la fermentación en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos en el presente documento para mejorar aún más el proceso de fermentación y, en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como el aumento de la velocidad y el rendimiento de etanol. Un "estimulador de la fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos de fermentación, en particular, la levadura. Los estimuladores de la fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Los ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, riboflavina y vitaminas A, B, C, D y E. véase, por ejemplo, Alfenore y col., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process," Springer-Verlag (2002). Los ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn y Cu.

[0198] Recuperación. Después de la fermentación, la sustancia orgánica de interés se recupera de la pulpa mediante cualquier método conocido en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, por afinidad, hidrofóbica, de cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos de electroforesis (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE, destilación o extracción. Por ejemplo, en una fermentación de etanol, el alcohol se separa de los polisacáridos de la pared celular vegetal fermentada y se purifica por métodos convencionales de destilación. Se puede obtener etanol con una pureza de hasta aproximadamente el 96 % en volumen de etanol, que se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible; etanol para el consumo en bebidas, es decir, bebidas alcohólicas neutras potables, o etanol industrial.

[0199] La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales

[0200] Los productos químicos utilizados como tampones y sustratos fueron productos comerciales con calidad de reactivo.

Cepas

[0201] *Trichoderma reesei* (sinónimo *Hypocrea jecorina*) RutC30 se utilizó como fuente de celulasa. *Trichoderma reesei* RutC30 está disponible en la American Type Culture Collection (ATCC 56765). *Trichoderma reesei* SMA135-04 es un derivado recombinante de *Trichoderma reesei* RutC30 que alberga múltiples copias del gen para beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* expresadas bajo el control transcripcional del promotor del gen *cbh1* de *Trichoderma reesei*.

Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión pAILo1

[0202] El vector de expresión pAILo1 se construyó mediante la modificación de pBAnE6 (patente de EE. UU. n.º 6,461,837), que comprende un híbrido de los promotores de los genes de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae* (promotor NA2-tpi), secuencia de terminación de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (terminador de AMG), y gen de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* (*amdS*) Todos los pasos de mutagénesis se verificaron mediante secuenciación usando química de terminador Big-Dye™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). La modificación de pBAnE6 se realizó eliminando primero tres sitios de restricción Nco I en las posiciones 2051, 2722 y 3397 pb del marcador de selección de *amdS* por mutagénesis dirigida. Todos los cambios se diseñaron que fueran "silenciosos", dejando la secuencia de proteínas real del producto génico de *amdS* sin cambios. La eliminación de estos tres sitios se realizó simultáneamente con un kit de mutagénesis dirigida *in vitro* GeneEditor™ (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando los siguientes cebadores (el nucleótido subrayado representa la base cambiada):

AMDS3NcoMut (2050):
5'-GTGCCCCATGATACGCCTCCGG-3' (SEQ ID NO: 1)
AMDS2NcoMut (2721):
5'-GAGTCGTATTTCCAAGGCTCCTGACC-3' (SEQ ID NO: 2)
AMDS1NcoMut (3396):
5'-GGAGGCCATGAAGTGACCAACGG-3' (SEQ ID NO: 3)

[0203] Luego, un plásmido que comprendía los tres cambios de secuencia esperados se sometió a mutagénesis dirigida, utilizando un kit de mutagénesis dirigida QuickChange™ (Stratagene, La Jolla, CA), para eliminar el sitio de restricción Nco I al final del terminador de AMG en la posición 1643. Los siguientes cebadores (el nucleótido subrayado representa la base cambiada) se usaron para la mutagénesis:

Cebador de 5' a 3' para mutagenizar la secuencia de terminación de AMG:

5'-CACCGTGAAAGCCATGCTCTTTCTTCGTGTAGAAGACCAGACAG-3' (SEQ ID NO: 4)

Cebador de 3'a 5' para mutagenizar la secuencia de terminación de AMG:

5'-CTGGTCTTCTACACGAAGGAAAGUNAGCATGGCTTTCACGGTGTCTG-3' (SEQ ID NO: 5)

5 [0204] El último paso en la modificación de pBANe6 fue la adición de un nuevo sitio de restricción Nco I al comienzo del poliligador utilizando un kit de mutagénesis dirigida QuickChange™ y los siguientes cebadores (los nucleótidos subrayados representan las bases cambiadas) para obtener pAlLo1 (Figura 6)

Cebador de 5' a 3' para mutagenizar el promotor NA2-tpi:

10 5'-CTATATACACAACCTGGATTTACCATGGGCCCGCGGCCGAGATC-3' (SEQ ID NO: 6)

Cebador de 3'a 5' para mutagenizar el promotor NA2-tpi:

5'-GATCTGCGGCCGCGGGCCCATGGTAAATCCAGTTGTGTATATAG-3' (SEQ ID NO: 7)

15 Ejemplo 2: Construcción del vector de expresión pMJ04

15 [0205] El vector de expresión pMJ04 se construyó mediante amplificación por PCR del terminador del gen de exocelobiohidrolasa 1 de *Trichoderma reesei* (*cbh1*) a partir de ADN genómico de *Trichoderma reesei* RutC30 usando los cebadores 993429 (antisentido) y 993428 (sentido) que se muestran a continuación. El cebador antisentido se diseñó para que tuviera un sitio *PacI* en el extremo 5' y un sitio *SpeI* en el extremo 3' del cebador sentido.

Cebador 993429 (antisentido): 5'-AACGTTAATTAAGGAATCGTTTTGTGTTT-3' (SEQ ID NO: 8)

Cebador 993428 (sentido): 5'-AGTACTAGTAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG-3' (SEQ ID NO: 9)

25 [0206] Se aisló ADN genómico de *Trichoderma reesei* RutC30 utilizando un kit DNeasy Maxi Plant (QIAGEN Inc., Valencia, CA).

30 [0207] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de reacción 1X ThermoPol (New England BioLabs, Beverly, MA), 0,3 mM de dNTP, 100 ng de ADN genómico de *Trichoderma reesei* RutC30, 0,3 µM de cebador 993429, 0,3 µM de cebador 993428 y 2 unidades de polimerasa Vent (New England BioLabs, Beverly, MA). Las reacciones se incubaron en un Mastercycler 5333 de Eppendorf programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C (extensión final de 15 minutos).

35 [0208] Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando 40 mM de Tris base - 20 mM de acetato de sodio - 1 mM de tampón de EDTA disódico (TAE) donde se extrajo una banda de producto de 229 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAGEN QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 [0209] El fragmento de PCR resultante se digirió con *Pac I* y *Spe I* y se ligó en pAlLo1 digerido con las mismas enzimas de restricción usando un kit de ligación rápida (Roche, Indianápolis, IN), para generar pMJ04 (Figura 2).

45 Ejemplo 3: Construcción del vector de expresión pCaHj568

45 [0210] El plásmido de expresión pCaHj568 se construyó a partir de pCaHj170 (Patente de EE. UU. 5,763,254) y pMT2188. El plásmido pCaHj170 comprende la región codificante de endoglucanasa V de *Humicola insolens* (EGV). El plásmido pMT2188 se construyó de la siguiente manera: el origen de replicación de pUC19 se amplificó por PCR a partir de pCaHj483 (WO 98/00529) con los cebadores 142779 y 142780 que se muestran a continuación. El cebador 142780 introduce un sitio *Bbu I* en el fragmento de PCR.

50 142779:

5'-TTGAATTGAAAATAGATTGATTTAAACTTC-3' (SEQ ID NO: 10)

142780:

5'-TTGCATGCGTAATCATGGTCATAGC-3' (SEQ ID NO: 11)

55 [0211] El sistema de PCR Expand (Roche Molecular Biochemicals, Basilea, Switzerland) se utilizó para la amplificación siguiendo las instrucciones del fabricante para esta y las posteriores amplificaciones por PCR. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa y se aisló y se purificó un fragmento de 1160 pb usando un kit de extracción de gel Jetquick (Genomed, Wielandstr, Alemania).

60 [0212] El gen *URA3* se amplificó a partir del vector de clonación general pYES2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando los cebadores 140288 y 142778 a continuación. El cebador 140288 introduce un sitio *Eco RI* en el fragmento de PCR.

65 140288:

5'-TTGAATTCATGGGTAATAACTGATAT-3' (SEQ ID NO: 12)

142778:

5'-AAATCAATCTATTTTCAATTCATCATT-3' (SEQ ID NO: 13)

5 Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa y se aisló y se purificó un fragmento de 1126 pb usando un kit de extracción de gel Jetquick.

[0213] Los dos fragmentos de PCR se fusionaron mezclándolos y amplificándolos usando los cebadores 142780 y 140288 mostrados anteriormente mediante empalme por método de superposición (Horton y col., 1989, Gene 77: 61-68) Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa y se aisló y se purificó un fragmento de 2263 pb usando un kit de extracción de gel Jetquick.

15 [0214] El fragmento resultante se digirió con *Eco* RI y *Bbu* I y se ligó al fragmento más grande de pCaHj483 digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligadura se usó para transformar *pyrF* de la cepa de *E. coli* DB6507 (ATCC 35673) hecha competente por el método de Mandel e Higa, 1970, J. Mol. Biol. 45: 154. Los transformantes se seleccionaron en medio sólido M9 (Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press) suplementado, por litro, con 1 g de casaminoácidos, 500 µg de tiamina y 10 mg de kanamicina. Se aisló un plásmido de un transformante y se designó como pCaHj527 (Figura 3).

20 [0215] El promotor NA2/tpi presente en pCaHj527 se sometió a mutagénesis dirigida mediante un método de PCR simple. Los nucleótidos 134-144 se convirtieron de G T A C T A A A A C C en C C G T T A A A T T T usando el cebador mutagénico 141223:

Cebador 141223:

25 5'-GGATGCTGTTGACTCCGGAAATTTAACGGTTTGGTCTTGCATCCC-3' (SEQ ID NO: 14)

Los nucleótidos 423-436 se convirtieron de A T G C A A T T T A A A C T en C G G C A A T T T A A C G G usando el cebador mutagénico 141222:

Cebador 141222:

30 5'-GGTATTGTCCTGCAGACGGCAATTTAACGGCTTCTGCGAATCGC-3' (SEQ ID NO: 15)

[0216] El plásmido resultante se designó como pMT2188 (Figura 4).

[0217] La región codificante de endoglucanasa V de *Humicola insolens* se transfirió desde pCaHj170 como fragmento de *Bam* HI-*Sa*I en pMT2188 digerido con *Bam* HI y *Xho* I para generar pCaHj568 (Figura 5).

35

Ejemplo 4: Construcción del vector de expresión pMJ05

40 [0218] El vector de expresión pMJ05 se construyó por PCR amplificando la región codificante de endoglucanasa V de *Humicola insolens* de 915 pb de pCaHj568 usando los cebadores HiEGV-F y HiEGV-R que se muestran a continuación.

HiEGV-F (sentido):

5'-AAGCTTAAGCATGCGTTCCTCCCCCTCC-3' (SEQ ID NO: 16)

HiEGV-R (antisentido):

45 5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEQ ID NO: 17)

[0219] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de reacción 1X ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 10 ng/µl de plásmido pCaHj568, 0,3 µM de cebador HiEGV-F, 0,3 µM de cebador HiEGV-R, y 2 U de polimerasa Vent. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C y 60 segundos a 72 °C, seguido de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 120 segundos a 72 °C (extensión final de 5 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 937 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55

[0220] Este fragmento purificado de 937 pb se usó como ADN de base para amplificaciones posteriores usando los siguientes cebadores:

HiEGV-R (antisentido):

60 5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEQ ID NO: 18)

HiEGV-F-overlap (sentido):

5'-ACCGCGGACTGCGCATCATGCGTTCCTCCCCCTCC-3' (SEQ ID NO: 19)

65 Las secuencias del cebador en cursiva son homólogas a 17 pb del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias de cebador subrayadas son homólogas a 29 pb de la región codificante de endoglucanasa V de

Humicola insolens. La superposición de 36 pb entre el promotor y la secuencia de codificación permitió la fusión precisa del fragmento de 994 pb que comprende el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* del fragmento de 918 pb que comprende el marco de lectura abierta de endoglucanasa V de *Humicola insolens*.

5 [0221] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de reacción 1X ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 1 ul de fragmento de PCR purificado de 937 pb, 0,3 µM de cebador de superposición HiEGV-F, 0,3 µM de cebador HiEGV-R y 2 U de polimerasa Vent. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C y 60 segundos a 72 °C, seguido de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 120 segundos a 72 °C (extensión final de 5 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 945 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 [0222] Se realizó una PCR por separado para amplificar la secuencia promotora de *cbh1* de *Trichoderma reesei* que se extiende desde 994 pb en dirección hacia 5' del codón de inicio ATG del gen de ADN genómico de *Trichoderma reesei* RutC30 usando los siguientes cebadores (el cebador de sentido se diseñó para que tuviera un sitio de restricción *Sal I* en el extremo 5'):

20 TrCBH1pro-F (sentido):
5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEQ ID NO: 20)
TrCBH1pro-R (antisentido):
5'-GATGCGCAGTCCGCGGT-3' (SEQ ID NO: 21)

25 [0223] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de reacción 1X ThermoPol, 0,3 mM dNTP, 100 ng de ADN genómico de *Trichoderma reesei* RutC30, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-F, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-R y 2 U de polimerasa Vent. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 120 segundos a 72 °C (extensión final de 5 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 998 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 [0224] El fragmento de PCR purificado de 998 pb se usó como ADN de base para amplificaciones posteriores usando los siguientes cebadores:

35 TrCBH1pro-F:
5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEQ ID NO: 22)
TrCBH1pro-R-overlap:
5'-GGAGGGGGGAGGAACGCATGATGCGCAGTCCGCGGT-3' (SEQ ID NO: 23)

40 [0225] Las secuencias en cursiva son homólogas a 17 pb del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias subrayadas son homólogas a 29 pb de la región codificante de endoglucanasa V de *Humicola insolens*. La superposición de 36 pb entre el promotor y la secuencia de codificación permitió la fusión precisa del fragmento de 994 pb que comprende el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* con el fragmento de 918 pb que comprende el marco de lectura abierta de endoglucanasa V de *Humicola insolens*.

45 [0226] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de reacción 1X ThermoPol, 0,3 mM dNTPs, 1 µl de fragmento de PCR purificado de 998 pb, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-F, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-R-overlap y 2 U de polimerasa Vent. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C y 60 segundos a 72 °C, seguido de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 120 segundos a 72 °C (extensión final de 5 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 1017 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 [0227] El fragmento de PCR del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* de 1017 pb y los fragmentos de PCR de endoglucanasa V de *Humicola insolens* de 945 pb se usaron como ADN de base para la amplificación posterior usando los siguientes cebadores para fusionar con precisión el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* de 994 pb con la región codificante de endoglucanasa V de *Humicola insolens* de 918 pb utilizando PCR de superposición:

60 TrCBH1pro-F:
5'-AAACGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATC-3' (SEQ ID NO: 24)
HiEGV-R:
5'-CTGCAGAATTCTACAGGCACTGATGGTACCAG-3' (SEQ ID NO: 25)

[0228] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de reacción 1X ThermoPol, 0,3 mM de dNTPs, 0,3 µM de cebador TrCBH1pro-F, 0,3 µM de cebador HiEGV-R y 2 U de polimerasa Vent. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 5 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C y 60 segundos a 72 °C, seguido de 25 ciclos cada uno durante 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 120 segundos a 72 °C (extensión final de 5 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 1926 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0229] El fragmento de 1926 pb resultante se clonó en pCR-Blunt-II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un kit de clonación de PCR ZeroBlunt TOPO siguiendo el protocolo del fabricante. El plásmido resultante se digirió con *Not* I y *Sal* I y el fragmento de 1926 pb se purificó y se ligó en pMJ04, que también se digirió con las mismas dos enzimas de restricción, para generar pMJ05 (Figura 6).

15 Ejemplo 5: Construcción del vector de expresión pSMai130

[0230] Un fragmento de ADN de 2586 pb que se extiende desde el codón de inicio ATG hasta el codón de parada TAA de la secuencia codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 26 para la secuencia de ADNc y SEQ ID NO: 27 para la secuencia de aminoácidos deducida; *E. coli* DSM 14240) se amplificó por PCR a partir de pJaL660 (WO 2002/095014) como base con los cebadores 993467 (sentido) y 993456 (antisentido) que se muestran a continuación. Un sitio *Spe* I se introdujo en el extremo 5' del cebador antisentido para facilitar la ligadura. Las secuencias del cebador en cursiva son homólogas a 24 pb del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias subrayadas son homólogas a 22 pb de la región codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Cebador 993467:

5'-ATAGTCAACCGCGGACTGCGCATCATGAAGCTTGGTTGGATCGAGG-3' (SEQ ID NO: 28)

Cebador 993456:

5'-ACTAGTTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3' (SEQ ID N.º: 29)

[0231] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de Tampón de amplificación *Pfx* (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,25 mM de dNTP, 10 ng de plásmido pJaL660, 6,4 µM de cebador 993467, 3,2 µM de cebador 993456, 1 mM de MgCl₂ y 2,5 U de polimerasa *Pfx* (Invitrogen, Carlsbad, California). Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C y 180 segundos a 72 °C (extensión final de 15 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE, donde se separó una banda de producto de 2586 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0232] Se realizó una PCR por separado para amplificar la secuencia promotora de *cbh1* de *Trichoderma reesei* que se extiende desde 1000 pb en dirección hacia 5' del codón de inicio ATG del gen, usando el cebador 993453 (sentido) y el cebador 993463 (antisentido) que se muestran a continuación para generar un fragmento de PCR de 1000 pb. Las secuencias del cebador en cursiva son homólogas a 24 pb del promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* y las secuencias de cebador subrayadas son homólogas a 22 pb de la región codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. La superposición de 46 pb entre el promotor y la secuencia de codificación permite la fusión precisa del fragmento de 1000 pb que comprende el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* del fragmento de 2586 pb que comprende el marco de lectura abierta de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Cebador 993453:

5'-GTCGACTCGAAGCCCGAATGTAGGAT-3' (SEQ ID NO: 30)

Cebador 993463:

5'-CCTCGATCCAACCAAGCTTCATGATGCGCAGTCCGCGGTTGACTA-3' (SEQ ID NO: 31)

[0233] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de Tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM de dNTP, 100 ng de ADN genómico de *Trichoderma reesei* RutC30, 6,4 µM de cebador 993453, 3,2 µM de cebador 993463, 1 mM de MgCl₂ y 2,5 U de polimerasa *Pfx*. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C y 180 segundos a 72 °C (extensión final de 15 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 1000 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0234] Los fragmentos purificados se usaron como base de ADN para la amplificación posterior usando el cebador 993453 (sentido) y el cebador 993456 (antisentido) que se muestran arriba para fusionar con precisión el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* de 1000 pb al fragmento de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de 2586 pb por PCR de superposición.

[0235] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM de dNTP, 6,4 µM de cebador 99353, 3,2 µM de cebador 993456, 1 mM de MgCl₂ y 2,5 U de polimerasa *Pfx*. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 60 °C y 240 segundos a 72 °C (extensión final de 15 minutos).

[0236] El fragmento de 3586 pb resultante se digirió con *SalI* y *SpeI* y se ligó en pMJ04, digerido con las mismas dos enzimas de restricción, para generar pSMai130 (Figura 7).

Ejemplo 6: Construcción de pSMai135

[0237] La región codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 2002/095014, *E. coli* DSM 14240, menos la secuencia señal, véase la Figura 8, la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 32) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 33) desde Lys-20 hasta el codón de parada TAA se amplificó por PCR a partir de pJaL660 (WO 2002/095014) como base con el cebador 993728 (sentido) y el cebador 993727 (antisentido) que se muestran a continuación. Las secuencias en cursiva son homólogas a 20 pb de la secuencia señal de endoglucanasa V de *Humicola insolens* y las secuencias subrayadas son homólogas a 22 pb de la región codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. Un sitio *Spe* se introdujo en el extremo 5' del cebador antisentido.

Cebador 993728:

5'-TGCCGGTGTGGCCCTTGCCAAGGATGATCTCGCGTACTCCC-3' (SEQ ID NO: 34)

Cebador 993727:

5'-GACTAGTCTTACTGGGCCTTAGGCAGCG-3' (SEQ ID NO: 35)

[0238] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM de dNTPs, 10 ng/µl de JaL660, 6,4 µM de cebador 993728, 3,2 µM de cebador 993727, 1 mM de MgCl₂ y 2,5 U de polimerasa *Pfx*. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C y 180 segundos a 72 °C (extensión final de 15 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 2523 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0239] Se realizó una amplificación por PCR separada para amplificar 1000 pb del promotor de celobiohidrolasa 1 de *Trichoderma reesei* Cel7A y 63 pb de la secuencia señal putativa de endoglucanasa V de *Humicola insolens* (codón de inicio de ATG para Ala-21, Figura 9, SEQ ID N°: 36 (secuencia de ADN) y 37 (secuencia de aminoácidos deducida; número de acceso AAB03660 para secuencia de ADN), usando cebador 993724 (sentido) y cebador 993729 (antisentido) que se muestran a continuación. La secuencia señal de endoglucanasa V de *Humicola insolens* y las secuencias de cebador subrayadas son homólogas a 22 pb de la región codificante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. El plásmido pMJ05, que comprende la región codificante de endoglucanasa V de *Humicola insolens* bajo el control del promotor *cbh1*, se utilizó como base para generar un fragmento de 1063 pb que comprende el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* el fragmento de secuencia señal de endoglucanasa V de *Humicola insolens*. Se compartió una superposición de 42 pb entre el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* la secuencia señal de endoglucanasa V de *Humicola insolens* y la secuencia de codificación de *Aspergillus oryzae* para proporcionar un enlace perfecto entre el promotor y el codón de inicio ATG de los 2523 pb de fragmento de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Cebador 993724:

5'-ACGCGTCGACCGAATGTAGGATTGTTATCC-3' (SEQ ID NO: 38)

Cebador 993729:

5'-GGGAGTACGCGAGATCATCCTTGGCAAGGGCCAACACCGGCA-3' (SEQ ID NO: 39)

[0240] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM de dNTP, 10 ng/µl de pMJ05, 6,4 µM de cebador 993728, 3,2 µM de cebador 993727, 1 mM de MgCl₂ y 2,5 U de polimerasa *Pfx*. Las reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 60 °C y 240 segundos a 72 °C (extensión final de 15 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE donde se separó una banda de producto de 1063 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0241] Los fragmentos superpuestos purificados se usaron como base para la amplificación usando el cebador 993724 (sentido) y el cebador 993727 (antisentido) descritos anteriormente para fusionar con precisión el promotor *cbh1* de *Trichoderma reesei* el fragmento de secuencia señal de endoglucanasa V de *Humicola insolens* de 1063 pb al fragmento de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de 2523 pb por PCR de superposición.

[0242] Las reacciones de amplificación (50 µl) estaban compuestas de tampón de amplificación *Pfx*, 0,25 mM de dNTP, 6,4 µM de cebador 993724, 3,2 µM de cebador 993727, 1 mM de MgCl₂ y 2,5 U de polimerasa *Pfx*. Las

reacciones se incubaron en un Eppendorf Mastercycler 5333 programado de la siguiente manera: 30 ciclos cada uno durante 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 60 °C y 240 segundos a 72 °C (extensión final de 15 minutos). Los productos de reacción se aislaron en un gel de agarosa al 1,0 % usando tampón TAE, donde se extrajo una banda de producto de 3591 pb del gel y se purificó usando un kit de extracción de gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0243] El fragmento de 3591 pb resultante se digirió con Sal I y Spe I y se ligó en pMJ04 digerido con las mismas enzimas de restricción para generar pSMai135 (Figura 10).

10 Ejemplo 7: Expresión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* en *Trichoderma reesei*

[0244] El plásmido pSMai130, en el que la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* se expresa a partir del promotor *cbh1* y la señal de secreción nativa (Figura 8), o pSMai135, que codifica la enzima beta-glucosidasa madura de *Aspergillus oryzae* enlazada a la señal de secreción de endoglucanasa V de *Humicola insolens* (Figura 9), se introdujo en *Trichoderma reesei* RutC30 por transformación mediada por PEG como se describe a continuación. Ambos plásmidos contienen el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* para permitir que los transformantes crezcan con acetamida como la única fuente de nitrógeno.

[0245] *Trichoderma reesei* RutC30 se cultivó a 27 °C y 90 rpm en 25 ml de medio YP (compuesto por litro de 10 g de extracto de levadura y 20 g de bactopectona) suplementado con glucosa al 2% (p/v) y 10 mM de uridina durante 17 horas. Los micelios se recogieron por filtración usando el sistema de filtración desechable al vacío de Millipore (Millipore, Bedford, MA) y se lavaron dos veces con agua desionizada y dos veces con 1,2 M de sorbitol. Los protoplastos se generaron suspendiendo el micelio lavado en 20 ml de sorbitol (1,2 M) que contenía 15 mg de Glucanex (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) por ml y 0,36 unidades de quitinasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) por ml e incubación durante 15-25 minutos a 34 °C con agitación suave a 90 rpm. Los protoplastos se recogieron por centrifugación durante 7 minutos a 400 x g y se lavaron dos veces con 1,2 M de sorbitol frío. Los protoplastos se contaron usando un hemacitómetro y se volvieron a suspender en STC (sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 6,5, 10 mM₂ de CaCl) a una concentración final de 1 X 10⁸ protoplastos por ml. Los protoplastos sobrantes se almacenaron en un recipiente de congelación Cryo a 1 °C (Nalgene, Rochester, NY) a -80 °C.

[0246] Aproximadamente 7 µg de plásmido de expresión digerido por *Pme* I (pSMai130 o pSMai135) se añadieron a 100 µl de solución de protoplasto y se mezclaron suavemente, seguido de 260 µl de tampón PEG (PEG-4000 al 60 %, Tris-HCl al 10 %, pH 6,5, 10 mM de CaCl₂), se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se agregó STC (3 ml) y se mezcló y luego la solución de transformación se sembró en placas COVE (compuesto por litro de 342,3 g de sacarosa, 10 ml de solución de acetamida (1 M), 10 ml de solución de CsCl (1,5 M), 25 g de agar y 20 ml de solución de sales Cove; la solución de sales Cove estaba compuesta por litro de 26 g de KCl, 26 g de MgSO₄ · 7H₂O, 76 g de KH₂CO₄ y 50 ml de solución de metales traza Cove; La solución de metales traza Cove estaba compuesta por litro de 0,04 g de Na₂Si₄O₇ · 10H₂O, 0,4 g de CuSO₄ · 5H₂O, 1,2 g de FeSO₄ · 7H₂O, 0,7 g de MnSO₄ · H₂O, 0,8 g de Na₇MoO₇ · 2H₂O y 10 g de ZnSO₄ · 7H₂O). Las placas se incubaron a 28 °C durante 5-7 días. Los transformantes se subcultivaron en placas COVE2 (compuestas por litro de 30 g de sacarosa, 10 ml de solución de acetamida 1 M, 20 ml de solución de sales de Cove y 25 g de agar) y se cultivaron a 28 °C.

[0247] Se obtuvieron ciento diez transformantes positivos en *amdS* con pSMai130 y 65 transformantes con pSMai135. Veinte transformantes pSMai130 (señal de secreción nativa) y 67 pSMai135 (señal de secreción heteróloga) se subcultivaron en placas frescas que contenían acetamida y se dejaron esporular durante 7 días a 28 °C.

[0248] Los 20 transformantes pSMA130 y 67 transformante pSMA135 de *Trichoderma reesei* se cultivaron en matraces de agitación con deflectores de 125 ml que contenían 25 ml de medio inductor de celulasa a pH 6,0 inoculado con esporas de los transformantes y se incubaron a 28 °C y 200 rpm durante 7 días. *Trichoderma reesei* RutC30 se ejecutó como control. Las muestras de caldo de cultivo se retiraron el día 7. Un ml de cada caldo de cultivo se centrifugó a 15 700 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el ensayo enzimático. Los sobrenadantes se analizaron para determinar la actividad beta-glucosidasa usando p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato, como se describe a continuación.

[0249] La actividad beta-glucosidasa se determinó a temperatura ambiente usando alícuotas de 25 µl de sobrenadantes de cultivo, diluidos 1:10 en 50 mM de succinato pH 5,0, usando 200 µl de 0,5 mg/ml de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato en 50 mM de succinato pH 5,0. Después de 15 minutos de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de Tris-HCl 1 M pH 8,0 y la absorbancia se leyó por espectrofotometría a 405 nm.

[0250] Una unidad de actividad beta-glucosidasa correspondió a la producción de 1 µmol de p-nitrofenilo por minuto por litro a pH 5,0, a temperatura ambiente. Se usó beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novozyme 188, Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) como estándar enzimático.

[0251] Los 20 transformantes SMA130 mostraron una actividad beta-glucosidasa equivalente a la de la cepa huésped, *Trichoderma reesei* RutC30. Por el contrario, varios transformantes SMA135 mostraron actividades de beta-glucosidasa varias veces superior a la de *Trichoderma reesei* RutC30. El transformante SMA135-04 produjo la mayor actividad beta-glucosidasa, con una actividad beta-glucosidasa siete veces mayor que la producida por *Trichoderma reesei* RutC30 como control.

[0252] La electroforesis en poli(acrilamida) con SDS se llevó a cabo usando geles Criterion Tris-HCl (5 % de resolución) (BioRad, Hercules, CA) con The Criterion System (BioRad, Hercules, CA). Se suspendieron cinco µl de sobrenadantes del día 7 (véase antes en el texto) en una concentración de 2X de tampón de muestra Laemmli (BioRad, Hercules, CA) y se hirvieron durante 3 minutos en presencia de beta-mercaptoetanol al 5 %. Las muestras de sobrenadante se cargaron en un gel de poli(acrilamida) y se sometieron a electroforesis con Tris/Glicina/SDS 1X como tampón de migración (BioRad, Hercules, CA). El gel resultante se tiñó con la tinción BioSafe Coomassie Stain de BioRad.

[0253] Ninguna proteína beta-glucosidasa fue visible por SDS-PAGE para los sobrenadantes de caldo de cultivo de transformantes de *Trichoderma reesei* SMA130. En contraste, 26 de los 38 transformantes de *Trichoderma reesei* SMA135 produjeron una proteína de aproximadamente 110 kDa que no era visible en *Trichoderma reesei* RutC30 como control. El transformante de *Trichoderma reesei* SMA135-04 produjo el nivel más alto de beta-glucosidasa.

Ejemplo 8: fermentación de *Trichoderma reesei* SMA135-04

[0254] Se realizaron fermentaciones de *Trichoderma reesei* SMA135-04 para determinar el nivel de producción de la actividad beta-glucosidasa. *Trichoderma reesei* RutC30 (cepa huésped) se utilizó como control. Se inocularon esporas de *Trichoderma reesei* SMA135-04 en matraces de agitación de 500 ml, que contenían 100 ml de medio de inóculo compuesto por litro de 20 g de glucosa, 10 g de sólidos de maíz, 1,45 g de (NH₄)₂SO₄, 2,08 g de KH₂PO₄, 0,36 g de CaCl₂· 2H₂O, 0,42 g de MgSO₄· 7H₂O y 0,2 ml de solución de metales traza. La solución de metales traza estaba compuesta, por litro, de 216 g de FeCl₃· 6H₂O, 58 g de ZnSO₄· 7H₂O, 27 g de MnSO₄· H₂O, 10 g de CuSO₄· 5H₂O, 2,4 g de H₃BO₃ y 336 g de ácido cítrico. Los matraces se colocaron en un agitador orbital a 28 °C durante aproximadamente 48 horas, momento en el que se inocularon 50 ml del cultivo en 1,8 litros de medio de fermentación compuesto por litro de 4 g de glucosa, 10 g de sólidos de maíz, 30 g de celulosa, 2,64 g de CaCl₂· 2H₂O, 3,8 g de (NH₄)₂SO₄, 2,8 g de KH₂PO₄, 1,63 g de MgSO₄· 7H₂O, 0,75 ml de solución de metales traza (descrita anteriormente) en un recipiente de fermentación de 2 litros. Las fermentaciones se realizaron a un pH de 5,0, 28 °C, con un mínimo de oxígeno disuelto a un 25 % con un flujo de aire de 1,0 VVM y una agitación de 1100. El medio de alimentación se llevó al recipiente de fermentación a las 18 horas con una velocidad de alimentación de 3,6 g/hora durante 33 horas y luego de 7,2 g/hora. Las fermentaciones duraron 165 horas, tiempo en el cual los caldos de fermentación finales se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta el ensayo de actividad beta-glucosidasa usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 7.

[0255] Se determinó que la actividad beta-glucosidasa en la muestra de fermentación de *Trichoderma reesei* SMA135-04 era aproximadamente ocho veces mayor que la producida por *Trichoderma reesei* RutC30.

Ejemplo 9: hidrólisis de PCS usando muestras de fermentación nuevas

[0256] Las reacciones de hidrólisis de PCS se formularon utilizando rastrojo de maíz lavado y molido que se pretrató con ácido sulfúrico diluido a temperatura y presión elevadas. Se usaron las siguientes condiciones para el pretratamiento: concentración de ácido - 1,4% en peso; temperatura - 165 °C; presión 107 psi; tiempo - 8 minutos. Antes de la hidrólisis enzimática, el rastrojo de maíz pretratado (PCS) se lavó con un gran volumen de agua destilada y desionizada (DDI) en un filtro de vidrio. Se descubrió que el peso seco del PCS lavado con agua era del 24,54 %. Los sólidos insolubles en agua presentes en el PCS contenían un 56,5 % de celulosa, un 4,6 % de hemicelulosa y un 28,4 % de lignina.

[0257] Antes de la hidrólisis enzimática, se preparó una suspensión de PCS molido en agua DDI de la siguiente manera: el PCS lavado con agua DDI se lavó adicionalmente con etanol al 95 % en un filtro Millipore de 22 µm (6P Express Membrane, Stericup), y luego se molió usando un molinillo de café para reducir el tamaño de partícula. Se descubrió que el peso seco del PCS molido era del 41,8 %. El PCS molido se lavó con agua DDI tres veces para eliminar el etanol. Después de cada lavado, la suspensión se centrifugó a 17,000 x g durante 10 minutos a 4 °C para separar los sólidos. Finalmente, se añadió agua DDI a los sólidos molidos lavados con agua para crear una suspensión de 20 mg/ml. La suspensión se almacenó a 4°C y se usó para la hidrólisis de PCS a escala de 1 ml a una concentración final de 10 mg/ml.

[0258] Las cepas de *Trichoderma reesei* se cultivaron en fermentadores de laboratorio Applikon de dos litros utilizando un medio productor de celulosa a 28 °C, pH 4,5 y un tiempo de crecimiento de aproximadamente 120 horas. El medio productor de celulosa estaba compuesto, por litro, de 5 g de glucosa, 10 g de sólidos de maíz, 2,08 g de CaCl₂, 3,87 g de (NH₄)₂SO₄, 2,8 g de KH₂PO₄, 1,63 g de MgSO₄· 7H₂O, 0,75 ml de solución de metales

traza y 1,8 ml de pluronic con una alimentación de 20 g de celulosa por litro. La solución de metales traza estaba compuesta, por litro, de 216 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 58 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 27 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,4 g de H_3BO_3 y 336 g de ácido cítrico.

5 [0259] El procedimiento para la preparación de muestras de caldo de fermentación completo (WB) y caldo sin células (CB) se describe a continuación. Brevemente, dos alícuotas de 50 ml de cultivo de *Trichoderma reesei* se cosecharon asépticamente en tubos de centrifuga cónicos. Uno de estos tubos se designó como la preparación de la enzima WB sin tratamiento adicional, y el otro se centrifugó dos veces para eliminar células y material insoluble para producir una muestra de enzima CB. La primera centrifugación fue a baja velocidad (1800 x g durante 10 minutos), y la segunda fue a mayor velocidad (12,000 x g durante 15 minutos).

15 [0260] Se hidrolizó enzimáticamente PCS (10 mg/ml, 56,5 % de celulosa) a 50 °C en tampón de acetato de sodio 0,05 M (pH 5,0) con mezcla intermitente. Se utilizaron dos tipos de preparaciones enzimáticas en estos experimentos: (a) Caldo de fermentación completo (WB) y (b) caldo de fermentación centrifugado (CB) como se ha definido antes. En una serie de experimentos, el CB que se centrifugó antes del almacenamiento (CB-A) durante dos semanas a 4 °C se comparó con el caldo que se centrifugó después del almacenamiento (CB-B). Se probaron cuatro dosis de enzimas: 2,5, 5,0, 10 y 20 mg/g de PCS. Estas dosis se basaron en concentraciones de proteína estimadas de 60 g/L para fermentaciones estándar a escala de laboratorio. El volumen de cada reacción fue de 20 20 1 ml en placas de pocillos profundos MicroWell96™ (Fisher Scientific, Pittsburg, PA). En los puntos temporales especificados (1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas) se extrajeron alícuotas de 20 µl de las microplacas usando una pipeta de 8 canales y se agregaron a 180 µl de mezcla alcalina (0,102 M de Na_2CO_3 + 0,058 M de NaHCO_3) en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Millipore, Billerica, MA) para terminar la reacción. Las muestras se centrifugaron a 1800 x g durante 15 minutos para eliminar el residuo de PCS sin reaccionar. Después de las diluciones apropiadas, los filtrados se analizaron para determinar los azúcares reductores (RS) usando un ensayo de microplaca (ver más adelante).

30 [0261] Las concentraciones de azúcares reductores (RS) en muestras de PCS hidrolizadas se midieron usando un ensayo de hidrazida del ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) (Lever, 1972, Anal. Biochem, 47: 273-279), que se modificó y adaptó a un formato de microplaca de 96 pocillos. Antes del ensayo, las muestras analizadas se diluyeron en agua para llevar la concentración de RS al rango de 0,005-0,200 mg/ml.

35 [0262] Se colocó una alícuota de 90 µl de cada muestra de reacción diluida en una microplaca de 96 pocillos de fondo cónico (Corning Inc., Costar, policarbonato transparente). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 60 µl de PHBAH al 1,25 % en hidróxido de sodio al 2%. Cada placa de ensayo se calentó en un bloque térmico a medida durante 10 minutos a 95 °C, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después del enfriamiento, se añadieron 60 µl de agua a cada pocillo. Se retiró una alícuota de 100 µl y se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Corning Inc., Costar, poliestireno de unión media), y la absorbancia a 405 nm (A_{405}) se midió utilizando un lector de microplacas UltraMark (Bio-Rad, Hercules, CA). Los valores de A_{405} se tradujeron a equivalentes de glucosa usando una curva estándar. Para aumentar la precisión estadística de los ensayos, se realizaron 32 réplicas para cada punto temporal en cada dosis de enzima.

45 [0263] Se generaron curvas estándar con ocho estándares de glucosa (0,000, 0,005, 0,010, 0,020, 0,030, 0,050, 0,075 y 0,100 mg/ml), que fueron tratados de manera similar a las muestras. Los estándares de glucosa se prepararon diluyendo una solución madre de glucosa de 10 mg/ml con una mezcla de carbonato de sodio/bicarbonato (0,102 M de Na_2CO_3 + 0,058 M de NaHCO_3). Se realizaron ocho réplicas de cada estándar para aumentar la precisión de los ensayos. El coeficiente de correlación medio para las curvas estándar fue superior a 0,99.

50 [0264] Las concentraciones de glucosa en cada muestra hidrolizada se midieron utilizando un método de ensayo ligado a enzimas en el que se mezclaron 50 µl de cada hidrolizado de PCS diluido con 100 µl de tampón de ensayo (MOPS 100 mM, pH 7, Tween-20 al 0,01%) y 150 µl de reactivo de ensayo de glucosa. El reactivo de ensayo contenía los siguientes ingredientes (por litro): 0,5511 g de ATP, 0,9951 g de NAD, 0,5176 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1000 Unidades/L de hexoquinasa Type 300 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 1000 Unidades/L de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,1 g de Tween -20 y 20,9 g de MOPS, pH 7,0. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la absorbancia se midió a 340 nm. La absorbancia de fondo se restó basándose en un control de glucosa cero, y las concentraciones de glucosa se determinaron con respecto a una curva estándar generada con concentraciones de glucosa que variaban de 0,00 a 0,25 mg/ml.

60 [0265] El rendimiento medio de RS (azúcares reductores) se calculó utilizando datos de todas las réplicas a una dosis de enzima y un tiempo de incubación particulares. El error estándar de la media (EEM) se calculó como la desviación estándar dividida por la raíz cuadrada de n, el número de repeticiones. El grado de conversión de celulosa en azúcar reductor (rendimiento de RS, porcentaje) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$65 \quad \begin{aligned} \text{Rendimiento de RS (\%)} &= \text{RS}_{(\text{mg/ml})} \times 100 \times 162 / (5.65_{(\text{mg/ml})} \times 180) \\ &= \text{RS}_{(\text{mg/ml})} \times 100 / (5.65_{(\text{mg/ml})} \times 1.111) \end{aligned}$$

En esta ecuación, RS es la concentración de azúcar reductor en solución medida en equivalentes de glucosa (mg/ml), 5,65 mg/ml es la concentración inicial de celulosa y el factor 1,111 refleja el aumento de peso en la conversión de celulosa en glucosa.

5 [0266] La probabilidad de que los puntos de datos de WB y CB representaran poblaciones estadísticamente diferentes se estimó utilizando una prueba t de Student (con varianza desigual) en cada punto temporal.

10 [0267] Como se muestra en la Figura 11, el uso de muestras de enzimas recién cosechadas (WB y CB) produjo perfiles de hidrólisis de PCS que eran casi idénticos. Estos perfiles no se pueden diferenciar con una prueba t de Student, lo que sugiere que eran estadísticamente indistinguibles. Usando muestras de enzimas de *Trichoderma reesei* RutC30, los rendimientos finales de RS oscilaron entre aproximadamente el 30 % de conversión del glucano total en la dosis de enzima más baja y aproximadamente el 50 % en la dosis más alta (Figura 11). Cuando se midió la concentración de glucosa en lugar de los azúcares reductores, surgió una imagen similar en el sentido de que los rendimientos de glucosa eran comparables independientemente de si se usaba WB o CB (Figura 12). Sin embargo, puede ser digno tener en cuenta que los rendimientos de glucosa fueran aproximadamente del 20 al 25 % más bajos que las concentraciones de azúcares reductores, lo que sugiere que la beta-glucosidasa podría ser una actividad enzimática limitante en estas condiciones.

20 [0268] En un esfuerzo por convertir un mayor porcentaje de RS en glucosa, se desplegaron muestras de enzimas de la cepa de *Trichoderma reesei* SMA135-04 recombinante que expresa un gen de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. Cuando se emplearon estas preparaciones con actividad elevada de beta-glucosidasa, se observaron varias diferencias basadas en una comparación con los resultados de las muestras de enzimas de *Trichoderma reesei* RutC30. Primero, dentro de los límites de los errores sistemáticos y experimentales, las curvas de hidrólisis de PCS para WB y CB fueron muy similares (Figura 13). En segundo lugar, a la dosis enzimática más baja (2,5 mg/g de PCS) los rendimientos finales de RS obtenidos de las muestras de enzimas de *Trichoderma reesei* SAM135-04 representaron aproximadamente el 40 % del glucano total hidrolizado en comparación con el 30 % para la enzima de *Trichoderma reesei* RutC30. En tercer lugar, los títulos finales de RS a dosis de enzimas más altas no cambiaron esencialmente en comparación con los obtenidos al usar preparaciones de WB y CB derivadas de *Trichoderma reesei* RutC30 (Figura 13). Las razones de este fenómeno no están claras, pero puede reflejar la inactivación térmica de endoglucanasas y celobiohidrolasas durante la incubación prolongada a 50 °C o la inhibición en el producto final de la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*. Sobre la base de estas comparaciones, los datos sugirieron de manera sistemática que hay poca diferencia entre los perfiles de hidrólisis de WB y CB. Tanto la cinética de reacción como los títulos finales de RS parecieron ser similares.

35 [0269] Cuando los rendimientos de RS y glucosa generados a partir de muestras de WB y CB de *Trichoderma reesei* SMA135-04 se compararon con los obtenidos de las preparaciones de *Trichoderma reesei* RutC30, se observó que las muestras de enzimas SMA135-04 convirtieron un porcentaje más alto de RS en glucosa (Figura 14). Esto no era inesperado, ya que *Trichoderma reesei* SMA135-04 produce niveles más altos de beta-glucosidasa que *Trichoderma reesei* RutC30. Curiosamente, en puntos temporales tempranos (hasta 24 horas), los niveles de RS y glucosa generados a partir de las preparaciones de enzimas de *Trichoderma reesei* SMA135-04 diferían solo en un pequeño porcentaje (Figura 14). Sin embargo, durante los pasos posteriores de las reacciones, las curvas de RS y glucosa divergen perceptiblemente, lo que sugiere que la actividad la beta-glucosidasa puede estar disminuyendo en los pasos posteriores de hidrólisis de PCS en estas condiciones. Esto fue particularmente evidente posteriormente para la dosis más alta de enzima (20 mg/g de PCS). Además, parecía que WB estaba superando a CB en la generación de RS y glucosa durante este mismo período de tiempo. Una prueba t de Student predijo que la varianza en los valores de RS era estadísticamente significativa ($P < 0,05$) durante el período de 48-120 horas. Se desconoce si la diferencia observada en el rendimiento se puede atribuir a enzimas específicas o efectos no específicos atribuidos a la presencia de micelios. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el fenómeno no se observó al usar muestras de enzimas WB y CB de *Trichoderma reesei* RutC30 (Figura 15), lo que sugiere la inestabilidad de la beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* heteróloga expresada por *Trichoderma reesei* SMA135-04 durante la incubación prolongada.

55 **Ejemplo 10: hidrólisis de PCS utilizando caldo de fermentación almacenado durante dos semanas a 4 °C**

[0270] Un esquema de proceso de biomasa a etanol que involucre la fabricación de enzimas en el sitio debe incorporar la suficiente flexibilidad para permitir el almacenamiento finito de las preparaciones de enzimas sin una pérdida significativa de potencia. Por lo tanto, se investigó si el almacenamiento en frío prolongado de muestras de enzimas afectaba a su rendimiento en reacciones de hidrólisis de PCS a escala de microtitulación. Además de WB, se probaron dos tipos de preparaciones de CB. Las muestras de CB-A se centrifugaron en el momento de la cosecha y se almacenaron a 4 °C como sobrenadante libre de células; Las preparaciones de CB-B se almacenaron a 4 °C como caldo completo, luego se centrifugaron para eliminar las células durante el ensayo.

65 [0271] Las reacciones de hidrólisis de PCS se realizaron como se describe en el Ejemplo 9.

[0272] Las Figuras 16 y 17 muestran que las curvas de hidrólisis para WB, CB-A y CB-B fueron principalmente similares. Los análisis estadísticos utilizando pruebas t de Student respaldaron que estos puntos de datos no eran apreciablemente diferentes. Además, los rendimientos finales de RS obtenidos usando muestras de enzimas que se almacenaron durante dos semanas fueron esencialmente los mismos que los obtenidos del uso de caldo de fermentación nuevo. Como se observó con material de caldo nuevo, la dosis más baja de enzima de *Trichoderma reesei* SMA135-04 (2,5 mg/g de PCS) produjo rendimientos de RS ligeramente más altos que la misma dosis de material Tv10, aparentemente debido a los niveles más altos de beta-glucosidasa producidos por *Trichoderma reesei* SMA135-04.

[0273] Estos resultados se pueden resumir de la siguiente manera:

1. WB parece funcionar tan bien como CB para la hidrólisis de PCS en las condiciones de ensayo descritas en esta serie de experimentos.
2. Es posible almacenar muestras de enzimas WB y CB de fermentaciones de *Trichoderma reesei* durante al menos dos semanas a 4 °C sin pérdida significativa de potencia en nuestro ensayo de hidrólisis.
3. CB puede procesarse a partir de WB que ha estado almacenado durante dos semanas a 4 °C sin pérdida apreciable de actividad en nuestro ensayo de hidrólisis.

[0274] En conjunto, los resultados sugirieron que es posible lograr resultados de hidrólisis de PCS similares usando WB en lugar de filtrados de cultivo fraccionados o formulados. Cabe destacar que los experimentos de hidrólisis se dosificaron en un volumen igual, y no se normalizaron en función de la actividad enzimática o la concentración de proteínas. En consecuencia, fue sorprendente haber observado un rendimiento equivalente de WB y CB dosificado de esta manera, ya que la masa de células fúngicas representó aproximadamente el 20-30 % del volumen en WB. Esto quiso decir que la dosis eficaz de enzima extracelular en las preparaciones de WB fue aproximadamente un 20-30 % más baja que la de CB.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0275]

<110> Novozymes Biotech, Inc.

<120> Métodos para degradar o convertir polisacáridos de la pared celular vegetal

<130> 10595.204-WO

<150> 60/556,779

<151> 2004-03-25

<160> 39

<170> versión de PatentIn 3.2

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> *Aspergillus nidulens*

<400> 1

gtgccccatg atacgcctcc gg

22

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> *Aspergillus nidulens*

<400> 2

gagtcgtatt tccaaggctc ctgacc

26

<210> 3

ES 2 810 026 T3

	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> <i>Aspergillus nidulens</i>		
5	<400> 3	ggaggccatg aagtggacca acgg	24
	<210> 4		
10	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> <i>Aspergillus niger</i>		
	<400> 4		
15	caccgtgaaa gccatgctct ttccttcgtg tagaagacca gacag		45
	<210> 5		
	<211> 45		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Aspergillus niger</i>		
	<400> 5		
25	ctgggtcttct acacgaagga aagagcatgg ctttcacggg gtctg		45
	<210> 6		
	<211> 44		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Aspergillus niger</i>		
	<400> 6		
	ctatatacac aactggattt accatggggc cgcgggccgca gatc		44
35			
	<210> 7		
	<211> 44		
	<212> ADN		
	<213> <i>Aspergillus niger</i>		
40			
	<400> 7		
	gatctgcggc cgcgggccca tggtaaattc agttgtgtat atag		44
45			
	<210> 8		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>		
50	<400> 8	aacgttaatt aaggaatcgt tttgtgttt	29
	<210> 9		
55	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>		
	<400> 9		
60	agtactagta gctccgtggc gaaagcctg		29

ES 2 810 026 T3

	<210> 10	
	<211> 31	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Humicola insolens</i>	
	<400> 10	
10	ttgaattgaa aatagattga tttaaaactt c	31
	<210> 11	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> <i>Humicola insolens</i>	
	<400> 11	
20	ttgcatgcgt aatcatggtc atagc	25
	<210> 12	
	<211> 26	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<400> 12	
	ttgaattcat gggtaataac tgatat	26
30	<210> 13	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
35	<400> 13	
	aatcaatct attttcaatt caattcatca tt	32
40	<210> 14	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus nidulens</i>	
	<400> 14	
45	ggatgctggt gactccggaa atttaacggt ttggtcttgc atccc	45
	<210> 15	
	<211> 44	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus nidulens</i>	
	<400> 15	
55	ggtattgtcc tgcagacggc aatttaacgg cttctgcgaa tcgc	44
	<210> 16	
	<211> 29	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Humicola insolens</i>	

ES 2 810 026 T3

	<400> 16		
	aagcttaagc atgcggttcct cccccctcc		29
5	<210> 17		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Humicola insolens		
10	<400> 17		
	ctgcagaatt ctacaggcac tgatggtacc ag		32
15	<210> 18		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Humicola insolens		
20	<400> 18		
	ctgcagaatt ctacaggcac tgatggtacc ag		32
25	<210> 19		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Humicola insolens		
30	<400> 19		
	accgcgact ggcgatcatg cgttccctccc ccctcc		36
35	<210> 20		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Trichoderma reesei		
40	<400> 20		
	aaacgtcgac cgaatgtagg attggtatc		29
45	<210> 21		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Trichoderma reesei		
50	<400> 21		
	gatgcgcagt ccgcggt		17
55	<210> 22		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Trichoderma reesei		
60	<400> 22		
	aaacgtcgac cgaatgtagg attggtatc		29
60	<210> 23		

ES 2 810 026 T3

```

<211> 36
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

5 <400> 23
ggaggggggga ggaacgcatg atgcgcagtc cgcggt 36

<210> 24
10 <211> 29
<212> ADN
<213> Trichoderma reesei

<400> 24
15 aaacgtcgac cgaatgtagg attggtatc 29

<210> 25
<211> 32
20 <212> ADN
<213> Humicola insolens

<400> 25
25 ctgcagaatt ctacaggcac tgatggtacc ag 32

<210> 26
<211> 2771
<212> ADN
30 <213> Aspergillus oryzae

<220>
<221> CDS
35 <222> (30)..(2612)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (87)..()
40

<400> 26
ctgttctgct ggttacctgc cacggtatc atg aag ctt ggt tgg atc gag gtg 53
Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val
-15

45 gcc gca ttg gcg gct gcc tca gta gtc agt gcc aag gat gat ctc gcg 101
Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val Val Ser Ala Lys Asp Asp Leu Ala
-10 -5 -1 1 5

50 tac tcc cct cct ttc tac cct tcc cca tgg gca gat ggt cag ggt gaa 149
Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu
10 15 20

55 tgg gcg gaa gta tac aaa cgc gct gta gac ata gtt tcc cag atg acg 197
Trp Ala Glu Val Tyr Lys Arg Ala Val Asp Ile Val Ser Gln Met Thr
25 30 35

60 ttg aca gag aaa gtc aac tta acg act gga aca gga tgg caa cta gag 245
Leu Thr Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr Gly Thr Gly Trp Gln Leu Glu
40 45 50

```

ES 2 810 026 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

agg tgt gtt gga caa act ggc agt gtt ccc aga ctc aac atc ccc agc 293
 Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser Val Pro Arg Leu Asn Ile Pro Ser
 55 60 65

ttg tgt ttg cag gat agt cct ctt ggt att cgt ttc tcg gac tac aat 341
 Leu Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu Gly Ile Arg Phe Ser Asp Tyr Asn
 70 75 80 85

tca gct ttc cct gcg ggt gtt aat gtc gct gcc acc tgg gac aag acg 389
 Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr
 90 95 100

ctc gcc tac ctt cgt ggt cag gca atg ggt gag gag ttc agt gat aag 437
 Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Gln Ala Met Gly Glu Glu Phe Ser Asp Lys
 105 110 115

ggt att gac gtt cag ctg ggt cct gct gct ggc cct ctc ggt gct cat 485
 Gly Ile Asp Val Gln Leu Gly Pro Ala Ala Gly Pro Leu Gly Ala His
 120 125 130

ccg gat ggc ggt aga aac tgg gaa ggt ttc tca cca gat cca gcc ctc 533
 Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu
 135 140 145

acc ggt gta ctt ttt gcg gag acg att aag ggt att caa gat gct ggt 581
 Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly
 150 155 160 165

gtc att gcg aca gct aag cat tat atc atg aac gaa caa gag cat ttc 629
 Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile Met Asn Glu Gln Glu His Phe
 170 175 180

cgc caa caa ccc gag gct gcg ggt tac gga ttc aac gta agc gac agt 677
 Arg Gln Gln Pro Glu Ala Ala Gly Tyr Gly Phe Asn Val Ser Asp Ser
 185 190 195

ttg agt tcc aac gtt gat gac aag act atg cat gaa ttg tac ctc tgg 725
 Leu Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp
 200 205 210

ccc ttc gcg gat gca gta cgc gct gga gtc ggt gct gtc atg tgc tct 773
 Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser
 215 220 225

tac aac caa atc aac aac agc tac ggt tgc gag aat agc gaa act ctg 821
 Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly Cys Glu Asn Ser Glu Thr Leu
 230 235 240 245

aac aag ctt ttg aag gcg gag ctt ggt ttc caa ggc ttc gtc atg agt 869
 Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser
 250 255 260

gat tgg acc gct cat cac agc ggc gta ggc gct gct tta gca ggt ctg 917
 Asp Trp Thr Ala His His Ser Gly Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu
 265 270 275

gat atg tcg atg ccc ggt gat gtt acc ttc gat agt ggt acg tct ttc 965
 Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Val Thr Phe Asp Ser Gly Thr Ser Phe
 280 285 290

ES 2 810 026 T3

5 tgg ggt gca aac ttg acg gtc ggt gtc ctt aac ggt aca atc ccc caa 1013
 Trp Gly Ala Asn Leu Thr Val Gly Val Leu Asn Gly Thr Ile Pro Gln
 295 300 305
 tgg cgt gtt gat gac atg gct gtc cgt atc atg gcc gct tat tac aag 1061
 Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val Arg Ile Met Ala Ala Tyr Tyr Lys
 310 315 320 325
 10 gtt ggc cgc gac acc aaa tac acc cct ccc aac ttc agc tcg tgg acc 1109
 Val Gly Arg Asp Thr Lys Tyr Thr Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr
 330 335 340
 15 agg gac gaa tat ggt ttc gcg cat aac cat gtt tcg gaa ggt gct tac 1157
 Arg Asp Glu Tyr Gly Phe Ala His Asn His Val Ser Glu Gly Ala Tyr
 345 350 355
 20 gag agg gtc aac gaa ttc gtg gac gtg caa cgc gat cat gcc gac cta 1205
 Glu Arg Val Asn Glu Phe Val Asp Val Gln Arg Asp His Ala Asp Leu
 360 365 370
 25 atc cgt cgc atc ggc gcg cag agc act gtt ctg ctg aag aac aag ggt 1253
 Ile Arg Arg Ile Gly Ala Gln Ser Thr Val Leu Leu Lys Asn Lys Gly
 375 380 385
 gcc ttg ccc ttg agc cgc aag gaa aag ctg gtc gcc ctt ctg gga gag 1301
 Ala Leu Pro Leu Ser Arg Lys Glu Lys Leu Val Ala Leu Leu Gly Glu
 390 395 400 405
 30 gat gcg ggt tcc aac tcg tgg ggc gct aac ggc tgt gat gac cgt ggt 1349
 Asp Ala Gly Ser Asn Ser Trp Gly Ala Asn Gly Cys Asp Asp Arg Gly
 410 415 420
 35 tgc gat aac ggt acc ctt gcc atg gcc tgg ggt agc ggt act gcg aat 1397
 Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn
 425 430 435
 40 ttc cca tac ctc gtg aca cca gag cag gcg att cag aac gaa gtt ctt 1445
 Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln Ala Ile Gln Asn Glu Val Leu
 440 445 450
 45 cag ggc cgt ggt aat gtc ttc gcc gtg acc gac agt tgg gcg ctc gac 1493
 Gln Gly Arg Gly Asn Val Phe Ala Val Thr Asp Ser Trp Ala Leu Asp
 455 460 465
 aag atc gct gcg gct gcc cgc cag gcc agc gta tct ctc gtg ttc gtc 1541
 Lys Ile Ala Ala Ala Ala Arg Gln Ala Ser Val Ser Leu Val Phe Val
 470 475 480 485
 50 aac tcc gac tca gga gaa agc tat ctt agt gtg gat gga aat gag ggc 1589
 Asn Ser Asp Ser Gly Glu Ser Tyr Leu Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly
 490 495 500
 55 gat cgt aac aac atc act ctg tgg aag aac ggc gac aat gtg gtc aag 1637
 Asp Arg Asn Asn Ile Thr Leu Trp Lys Asn Gly Asp Asn Val Val Lys
 505 510 515
 60 acc gca gcg aat aac tgt aac aac acc gtg gtc atc atc cac tcc gtc 1685
 Thr Ala Ala Asn Asn Cys Asn Asn Thr Val Val Ile Ile His Ser Val
 520 525 530

ES 2 810 026 T3

5 gga cca gtt ttg atc gat gaa tgg tat gac cac ccc aat gtc act ggt 1733
 Gly Pro Val Leu Ile Asp Glu Trp Tyr Asp His Pro Asn Val Thr Gly
 535 540 545

10 att ctc tgg gct ggt ctg cca ggc cag gag tct ggt aac tcc atc gcc 1781
 Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly Asn Ser Ile Ala
 550 555 560 565

15 gat gtg ctg tac ggt cgt gtc aac cct ggc gcc aag tct cct ttc act 1829
 Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn Pro Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr
 570 575 580

20 tgg ggc aag acc cgg gag tcg tat ggt tct ccc ttg gtc aag gat gcc 1877
 Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Ser Pro Leu Val Lys Asp Ala
 585 590 595

25 aac aat ggc aac gga gcg ccc cag tct gat ttc acc cag ggt gtt ttc 1925
 Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln Ser Asp Phe Thr Gln Gly Val Phe
 600 605 610

30 atc gat tac cgc cat ttc gat aag ttc aat gag acc cct atc tac gag 1973
 Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys Phe Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu
 615 620 625

35 ttt ggc tac ggc ttg agc tac acc acc ttc gag ctc tcc gac ctc cat 2021
 Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Glu Leu Ser Asp Leu His
 630 635 640 645

40 gtt cag ccc ctg aac gcg tcc cga tac act ccc acc agt ggc atg act 2069
 Val Gln Pro Leu Asn Ala Ser Arg Tyr Thr Pro Thr Ser Gly Met Thr
 650 655 660

45 gaa gct gca aag aac ttt ggt gaa att ggc gat gcg tcg gag tac gtg 2117
 Glu Ala Ala Lys Asn Phe Gly Glu Ile Gly Asp Ala Ser Glu Tyr Val
 665 670 675

50 tat ccg gag ggg ctg gaa agg atc cat gag ttt atc tat ccc tgg atc 2165
 Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Arg Ile His Glu Phe Ile Tyr Pro Trp Ile
 680 685 690

55 aac tct acc gac ctg aag gca tcg tct gac gat tct aac tac ggc tgg 2213
 Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser Ser Asp Asp Ser Asn Tyr Gly Trp
 695 700 705

60 gaa gac tcc aag tat att ccc gaa ggc gcc acg gat ggg tct gcc cag 2261
 Glu Asp Ser Lys Tyr Ile Pro Glu Gly Ala Thr Asp Gly Ser Ala Gln
 710 715 720 725

65 ccc cgt ttg ccc gct agt ggt ggt gcc gga gga aac ccc ggt ctg tac 2309
 Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly Ala Gly Asn Pro Gly Leu Tyr
 730 735 740

70 gag gat ctt ttc cgc gtc tct gtg aag gtc aag aac acg ggc aat gtc 2357
 Glu Asp Leu Phe Arg Val Ser Val Lys Val Lys Asn Thr Gly Asn Val
 745 750 755

75 gcc ggt gat gaa gtt cct cag ctg tac gtt tcc cta ggc ggc ccg aat 2405
 Ala Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn
 760 765 770

ES 2 810 026 T3

gag ccc aag gtg gta ctg cgc aag ttt gag cgt att cac ttg gcc cct 2453
 Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys Phe Glu Arg Ile His Leu Ala Pro
 775 780 785
 5
 tcg cag gag gcc gtg tgg aca acg acc ctt acc cgt cgt gac ctt gca 2501
 Ser Gln Glu Ala Val Trp Thr Thr Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ala
 790 795 800 805
 10
 aac tgg gac gtt tcg gct cag gac tgg acc gtc act cct tac ccc aag 2549
 Asn Trp Asp Val Ser Ala Gln Asp Trp Thr Val Thr Pro Tyr Pro Lys
 810 815 820
 15
 acg atc tac gtt gga aac tcc tca cgg aaa ctg ccg ctc cag gcc tcg 2597
 Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Gln Ala Ser
 825 830 835
 20
 ctg cct aag gcc cag taaggggcaa gtcctgattg tacagagcat ttcgagattt 2652
 Leu Pro Lys Ala Gln
 840
 atgatgtaca tgtttatgaa tgacctaggg tagggtaata cttagtaggg ttagttctaa 2712
 25
 ttcttggagt caagtattga ctcaactgggc cgataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2771
 <210> 27
 <211> 861
 <212> PRT
 30 <213> *Aspergillus oryzae*
 <400> 27
 35 Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val
 -15 -10 -5
 40 Val Ser Ala Lys Asp Asp Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser
 -1 1 5 10
 Pro Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Glu Val Tyr Lys Arg Ala
 15 20 25
 45 Val Asp Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Thr Glu Lys Val Asn Leu Thr
 30 35 40 45
 50 Thr Gly Thr Gly Trp Gln Leu Glu Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser
 50 55 60
 55 Val Pro Arg Leu Asn Ile Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu
 65 70 75
 60 Gly Ile Arg Phe Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn
 80 85 90

ES 2 810 026 T3

Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Gln Ala
 95 100 105

5
 Met Gly Glu Glu Phe Ser Asp Lys Gly Ile Asp Val Gln Leu Gly Pro
 110 115 120 125

10
 Ala Ala Gly Pro Leu Gly Ala His Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu
 130 135 140

15
 Gly Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr
 145 150 155

20
 Ile Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Ile Ala Thr Ala Lys His Tyr
 160 165 170

25
 Ile Met Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Gln Pro Glu Ala Ala Gly
 175 180 185

30
 Tyr Gly Phe Asn Val Ser Asp Ser Leu Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys
 190 195 200 205

35
 Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala
 210 215 220

40
 Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr
 225 230 235

45
 Gly Cys Glu Asn Ser Glu Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu
 240 245 250

50
 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Thr Ala His His Ser Gly
 255 260 265

55
 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Val
 270 275 280 285

60
 Thr Phe Asp Ser Gly Thr Ser Phe Trp Gly Ala Asn Leu Thr Val Gly
 290 295 300

65
 Val Leu Asn Gly Thr Ile Pro Gln Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val
 305 310 315

70
 Arg Ile Met Ala Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Thr Lys Tyr Thr
 320 325 330

ES 2 810 026 T3

Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Phe Ala His
 335 340 345
 5
 Asn His Val Ser Glu Gly Ala Tyr Glu Arg Val Asn Glu Phe Val Asp
 350 355 360 365
 10 Val Gln Arg Asp His Ala Asp Leu Ile Arg Arg Ile Gly Ala Gln Ser
 370 375 380
 15 Thr Val Leu Leu Lys Asn Lys Gly Ala Leu Pro Leu Ser Arg Lys Glu
 385 390 395
 20 Lys Leu Val Ala Leu Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Ser Trp Gly
 400 405 410
 25 Ala Asn Gly Cys Asp Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met
 415 420 425
 30 Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
 430 435 440 445
 35 Gln Ala Ile Gln Asn Glu Val Leu Gln Gly Arg Gly Asn Val Phe Ala
 450 455 460
 40 Val Thr Asp Ser Trp Ala Leu Asp Lys Ile Ala Ala Ala Ala Arg Gln
 465 470 475
 45 Ala Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ser Asp Ser Gly Glu Ser Tyr
 480 485 490
 50 Leu Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Asn Asn Ile Thr Leu Trp
 495 500 505
 55 Lys Asn Gly Asp Asn Val Val Lys Thr Ala Ala Asn Asn Cys Asn Asn
 510 515 520 525
 60 Thr Val Val Ile Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Glu Trp
 530 535 540
 Tyr Asp His Pro Asn Val Thr Gly Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly
 545 550 555
 Gln Glu Ser Gly Asn Ser Ile Ala Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
 560 565 570
 60

ES 2 810 026 T3

Pro Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 575 580 585
 5
 Gly Ser Pro Leu Val Lys Asp Ala Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 590 595 600 605
 10 Ser Asp Phe Thr Gln Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 610 615 620
 15 Phe Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr
 625 630 635
 20 Thr Phe Glu Leu Ser Asp Leu His Val Gln Pro Leu Asn Ala Ser Arg
 640 645 650
 25 Tyr Thr Pro Thr Ser Gly Met Thr Glu Ala Ala Lys Asn Phe Gly Glu
 655 660 665
 30 Ile Gly Asp Ala Ser Glu Tyr Val Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Arg Ile
 670 675 680 685
 35 His Glu Phe Ile Tyr Pro Trp Ile Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser
 690 695 700
 40 Ser Asp Asp Ser Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Lys Tyr Ile Pro Glu
 705 710 715
 45 Gly Ala Thr Asp Gly Ser Ala Gln Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly
 720 725 730
 50 Ala Gly Gly Asn Pro Gly Leu Tyr Glu Asp Leu Phe Arg Val Ser Val
 735 740 745
 55 Lys Val Lys Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu
 750 755 760 765
 60 Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys
 770 775 780
 Phe Glu Arg Ile His Leu Ala Pro Ser Gln Glu Ala Val Trp Thr Thr
 785 790 795
 Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Ser Ala Gln Asp
 800 805 810

ES 2 810 026 T3

Trp Thr Val Thr Pro Tyr Pro Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser Ser
 815 820 825

5

Arg Lys Leu Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Lys Ala Gln
 830 835 840

- 10 <210> 28
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae
- 15 <400> 28
 atagtcaacc gcggactgcg catcatgaag cttggttggg tcgagg 46
- 20 <210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae
- 25 <400> 29
 actagtttac tgggccttag gcagcg 26
- 30 <210> 30
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae
- 35 <400> 30
 gtcgactcga agcccgaatg taggat 26
- 40 <210> 31
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae
- 45 <400> 31
 cctcgatcca accaagcttc atgatgcgca gtccgcgggt gacta 45
- 50 <210> 32
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae
- 55 <400> 32
 atgaagcttg gttggatcga ggtggccgca ttggcggctg cccctcagta gcagtgc 57
- 60 <210> 33
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Aspergillus oryzae
- 60 <400> 33

ES 2 810 026 T3

Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val
 1 5 10 15

5 Val Ser Ala

10 <210> 34
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae

15 <400> 34
 tgccgggtggtt ggcccttgcc aaggatgatc tcgcgactc cc 42

20 <210> 35
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae

25 <400> 35
 gactagtctt actgggcctt aggcagcg 28

30 <210> 36
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Humicola insolens

35 <400> 36
 atgcgttcct cccccctcct ccgctccgcc gttgtggccg cctgcccgt gttggcctt 60
 gcc 63

40 <210> 37
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Humicola insolens

45 <400> 37
 Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
 1 5 10 15

50 Val Leu Ala Leu Ala
 20

55 <210> 38
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Aspergillus oryzae

60 <400> 38
 acgcgtcgac cgaatgtagg attggtatcc 30

ES 2 810 026 T3

5 <210> 39
<211> 42
<212> ADN
<213> *Aspergillus oryzae*

10 <400> 39
gggagtacgc gagatcatcc ttggcaaggg ccaacaccgg ca 42

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para degradar o convertir los polisacáridos de la pared celular vegetal en uno o más azúcares, que comprende: tratar los polisacáridos de la pared celular vegetal con una cantidad efectiva de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo fúngico filamentoso recombinante, en donde el microorganismo fúngico filamentoso recombinante expresa uno o más genes heterólogos que codifican la beta-glucosidasa.
- 10 2. Método de la reivindicación 1, en el que los polisacáridos de la pared celular vegetal se obtienen de una fuente seleccionada del grupo que consiste en material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, residuos de papel y residuos de la fabricación de pulpa y papel.
- 15 3. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el microorganismo fúngico filamentoso recombinante expresa además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una glucohidrolasa, xiloglucanasa, xilanasa, xilosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, alfa-glucuronidasa, acetilxilano esterasa, mananasa, manosidasa, alfa-galactosidasa, manano acetil esterasa, galactanasa, arabinanasa, pectato liasa, pectín liasa, poligalacturonasa, pectín acetil esterasa, pectín metil esterasa, beta-galactosidasa, ramnogalacturonasa, ramnogalacturonano liasa, ramnogalacturonano acetil esterasa, xilogalacturonosidasa, xilogalacturonasa, lignina peroxidasa, peroxidasa dependiente del manganeso, peroxidasa híbrida y lacasa.
- 20 4. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el microorganismo fúngico filamentoso recombinante expresa además uno o más genes heterólogos que codifican enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una esterasa, lipasa, oxidasa, fosfolipasa, fitasa, proteasa y peroxidasa.
- 25 5. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el caldo de fermentación completo usado del microorganismo recombinante se complementa con la adición de una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, endoglucanasa, celobiohidrolasa y beta-glucosidasa.
- 30 6. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el caldo de fermentación completo usado del microorganismo fúngico filamentoso recombinante se complementa con la adición de una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una glucohidrolasa, xiloglucanasa, xilanasa, xilosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, alfa-glucuronidasa, acetil xilano esterasa, mananasa, mannosidasa, alfa-galactosidasa, manano acetil esterasa, galactanasa, arabinanasa, pectato liasa, pectín, poligalacturonasa, pectín acetil esterasa, pectín metil esterasa, beta-galactosidasa, ramnogalacturonasa, ramnogalacturano liasa, ramnogalacturonano acetil esterasa, xilogalacturonosidasa, xilogalacturonasa, lignina peroxidasa, peroxidasa dependiente de manganeso, peroxidasa híbrida y lacasa.
- 35 7. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el caldo de fermentación completo usado del microorganismo fúngico filamentoso recombinante se complementa además con la adición de una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una esterasa, lipasa, oxidasa, fosfolipasa, fitasa, proteasa y peroxidasa.
- 40 8. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el método es un proceso de pretratamiento; un paso de un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF); o un paso de un proceso de hidrólisis y fermentación híbridas (HHF).
- 45 9. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la recuperación del azúcar o azúcares.
- 50 10. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que uno o más azúcares se seleccionan del grupo que consiste en glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa.
11. Método para producir una o más sustancias orgánicas, que comprende:
- 55 (a) sacarificar los polisacáridos de la pared celular vegetal con una cantidad efectiva de un caldo de fermentación completo usado de un microorganismo fúngico filamentoso recombinante, en el que el microorganismo fúngico filamentoso recombinante expresa uno o más genes heterólogos que codifican la beta-glucosidasa;
- 60 (b) fermentar el material sacarificado del paso (a) con uno o más microorganismos de fermentación; y
- (c) recuperar la sustancia o sustancias orgánicas de la fermentación.
12. Método de la reivindicación 11, en el que los polisacáridos de la pared celular vegetal se obtienen de una fuente seleccionada del grupo que consiste en material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, residuos de papel y residuos de la fabricación de pulpa y papel.
- 65

13. Método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente en una sacarificación y fermentación simultáneas.

5 14. Método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la sustancia o sustancias orgánicas se seleccionan del grupo que consiste en un alcohol, ácido orgánico, cetona, aldehído, aminoácido, gas y una combinación de estos.

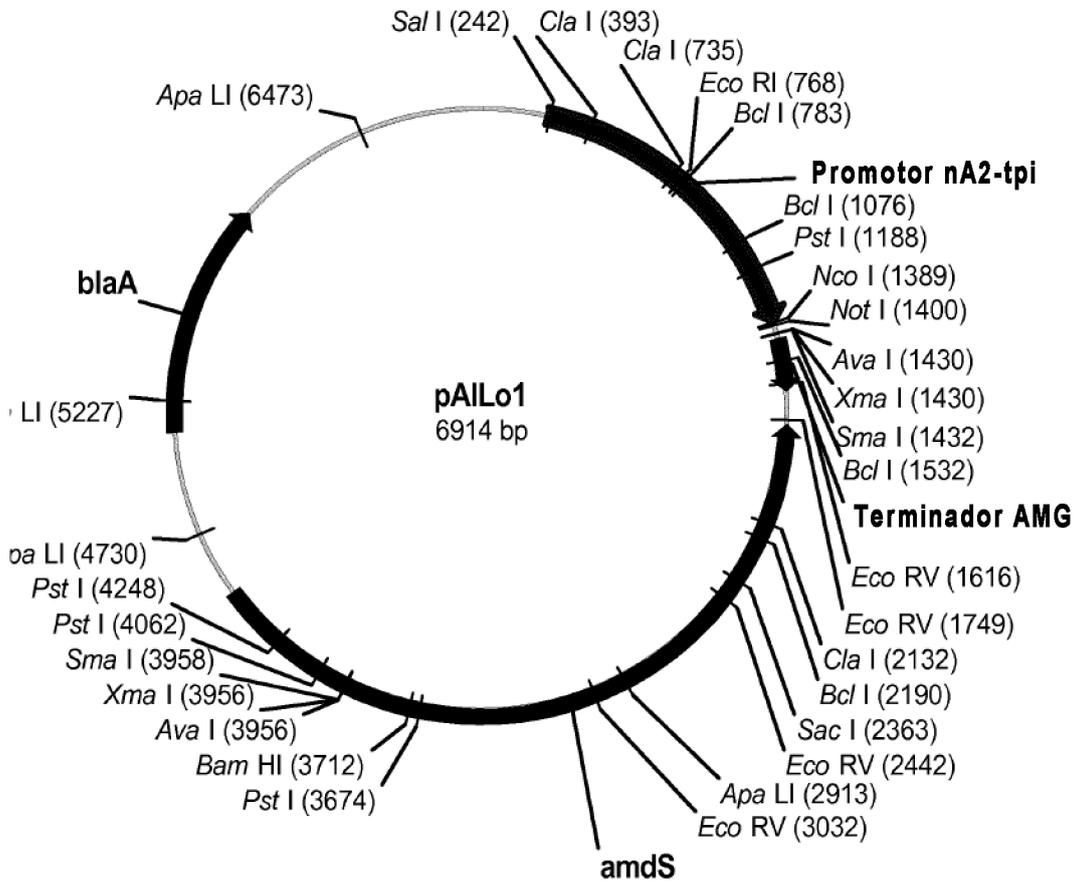


Fig. 1

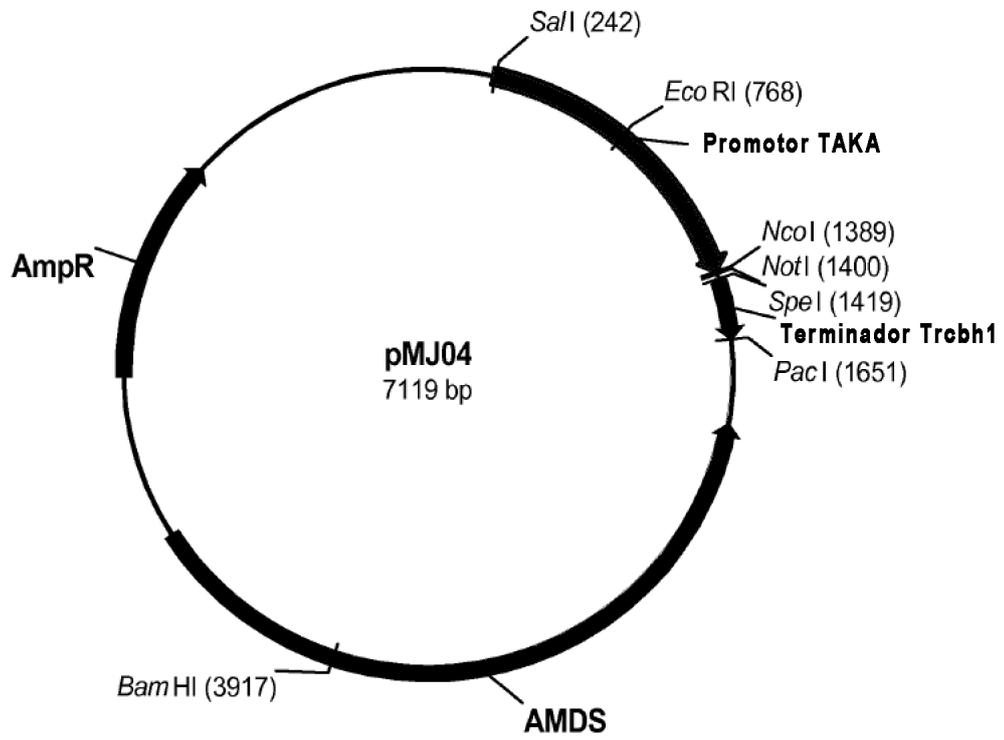


Fig. 2

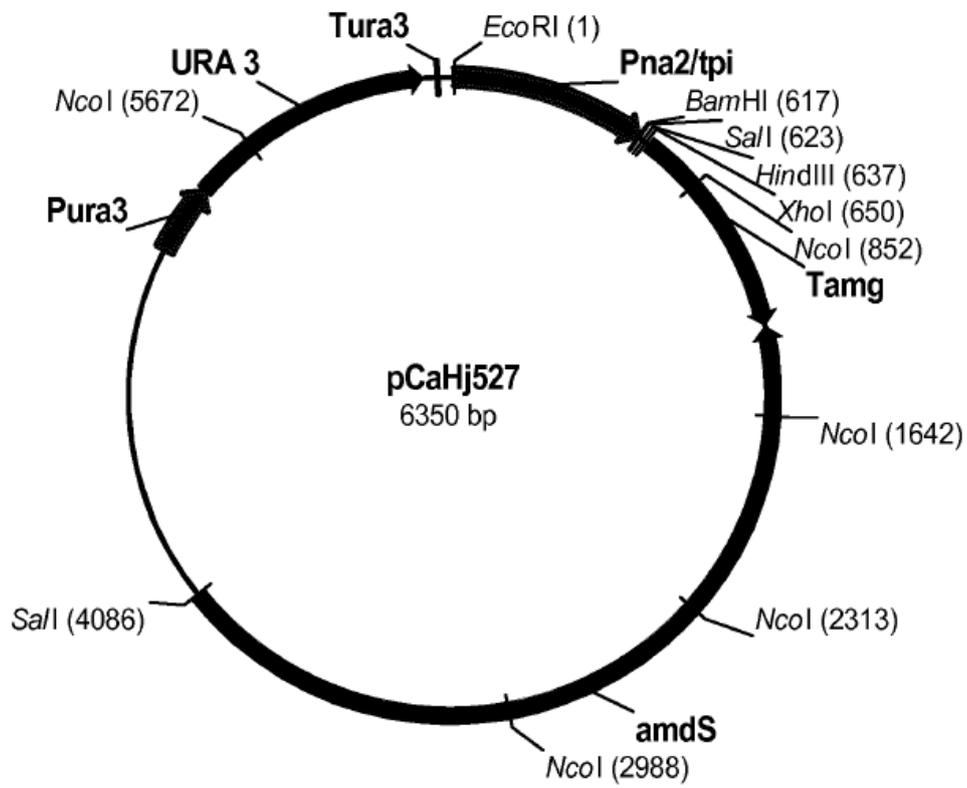


Fig. 3

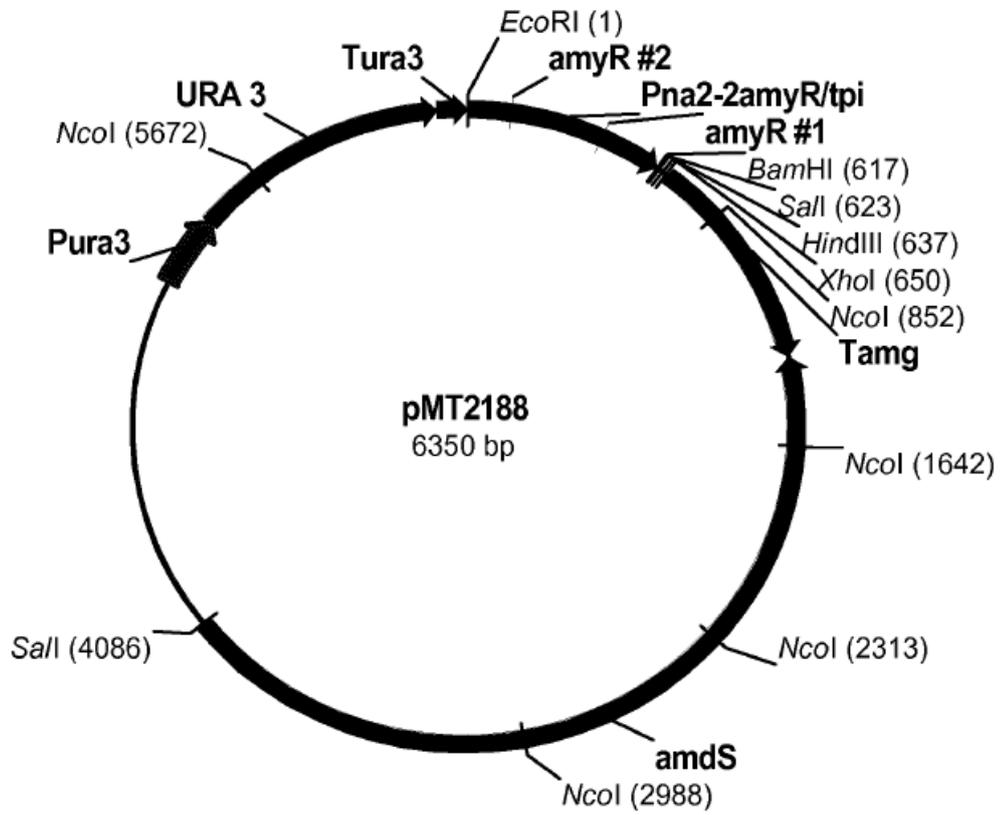


Fig. 4

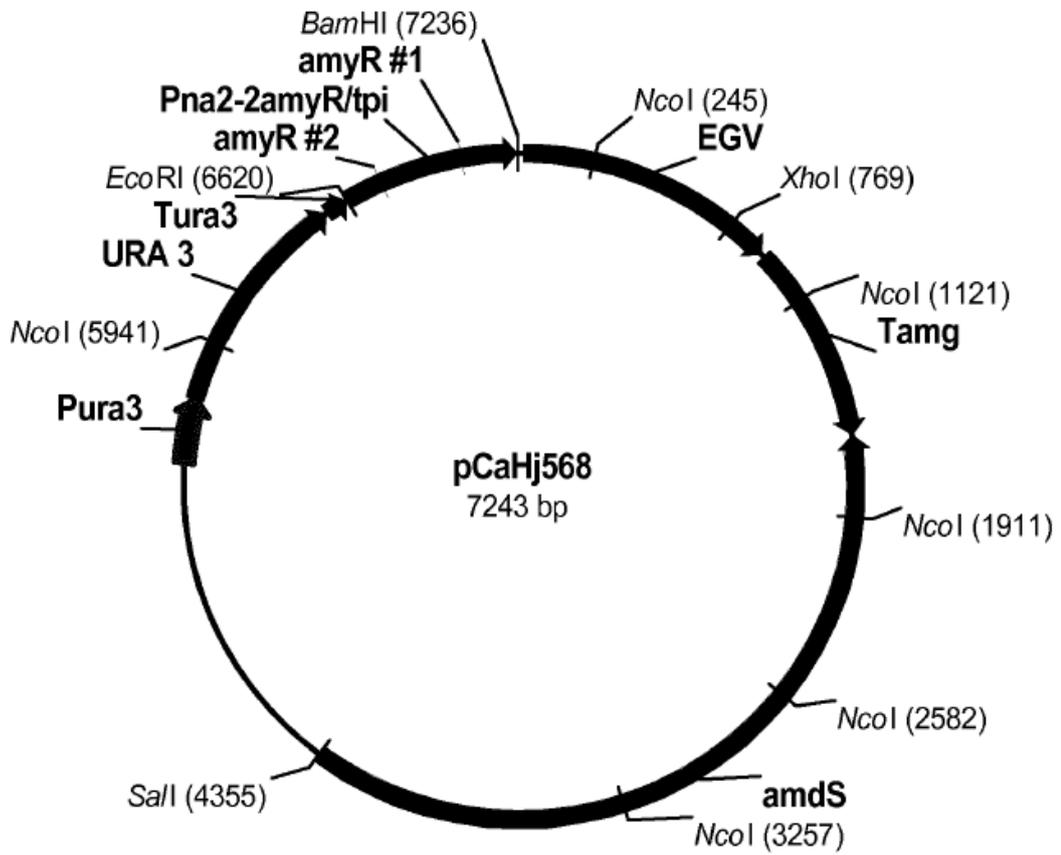


Fig. 5

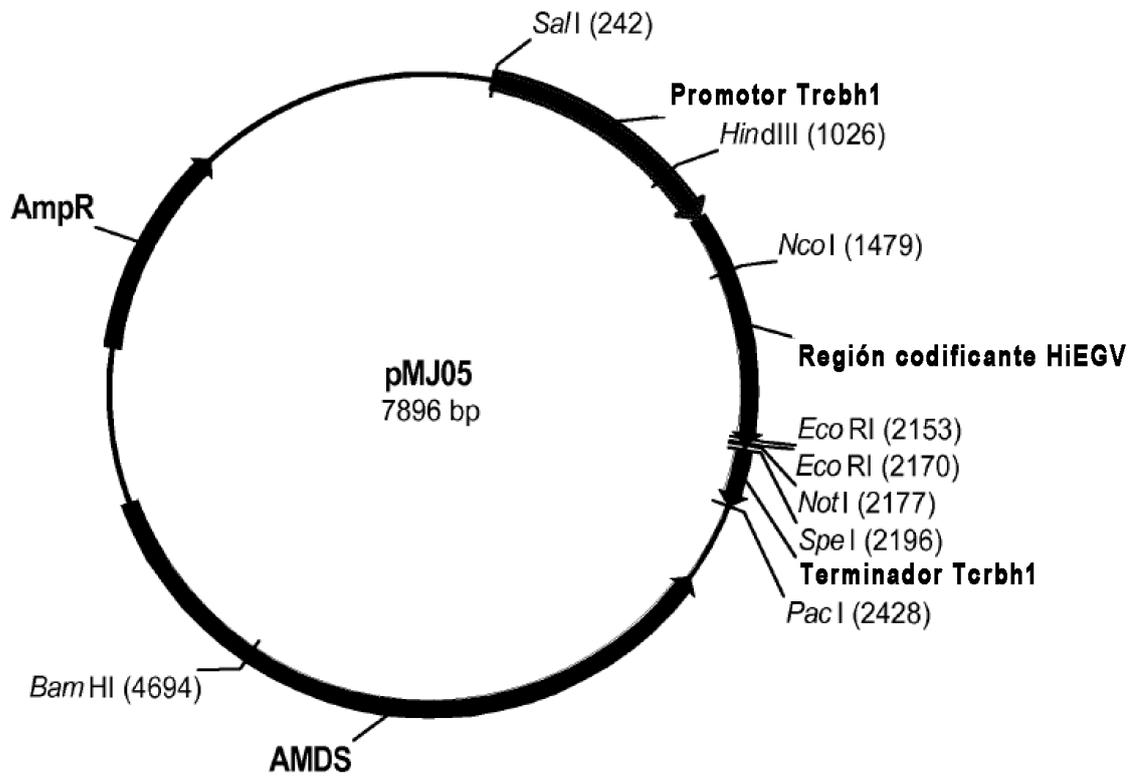


Fig. 6

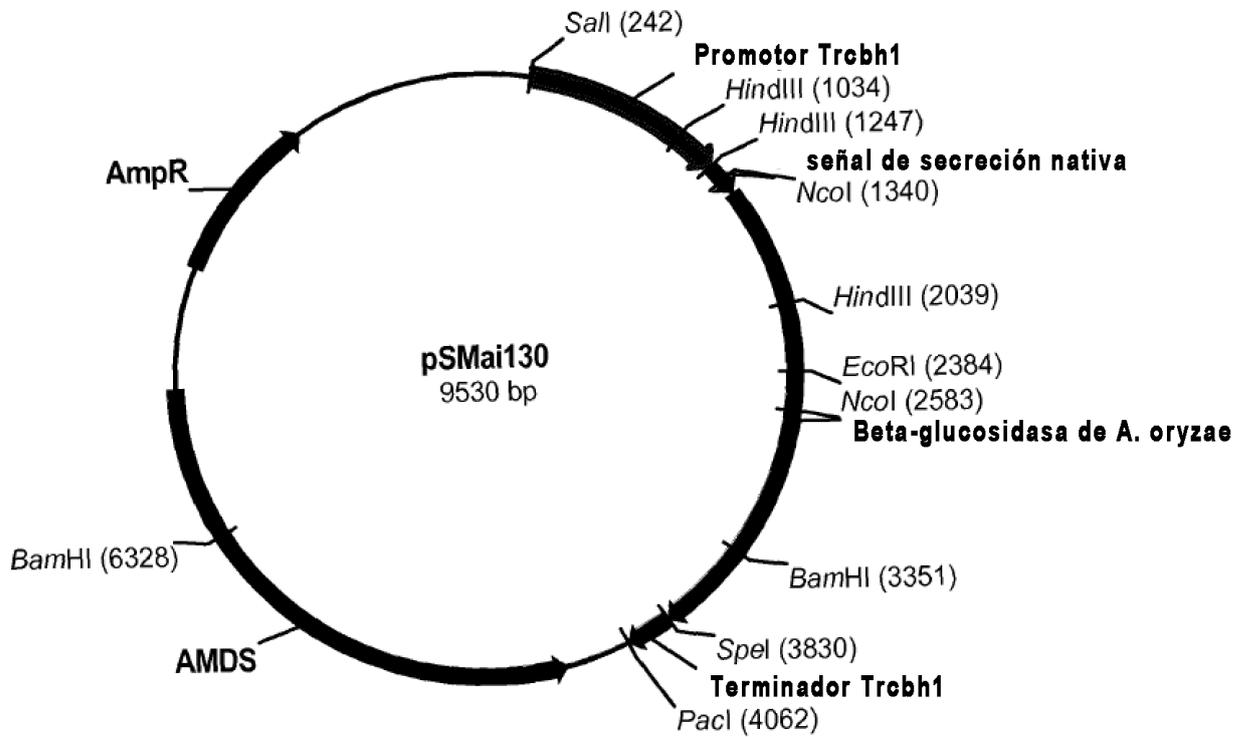


Fig. 7

Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val Val Ser Ala
ATG AAG CTT GGT TGG ATC GAG GTG GCC GCA TTG GCG GCT GCC CCT CAG TAG CAG TGC

Fig. 8

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro Val Leu Ala
ATG CGT TCC TCC CCC CTC CTC CGC TCC GCC GTT GTG GCC GCC CTG CCG GTG TTG GCC
Leu Ala
CTT GCC

Fig. 9

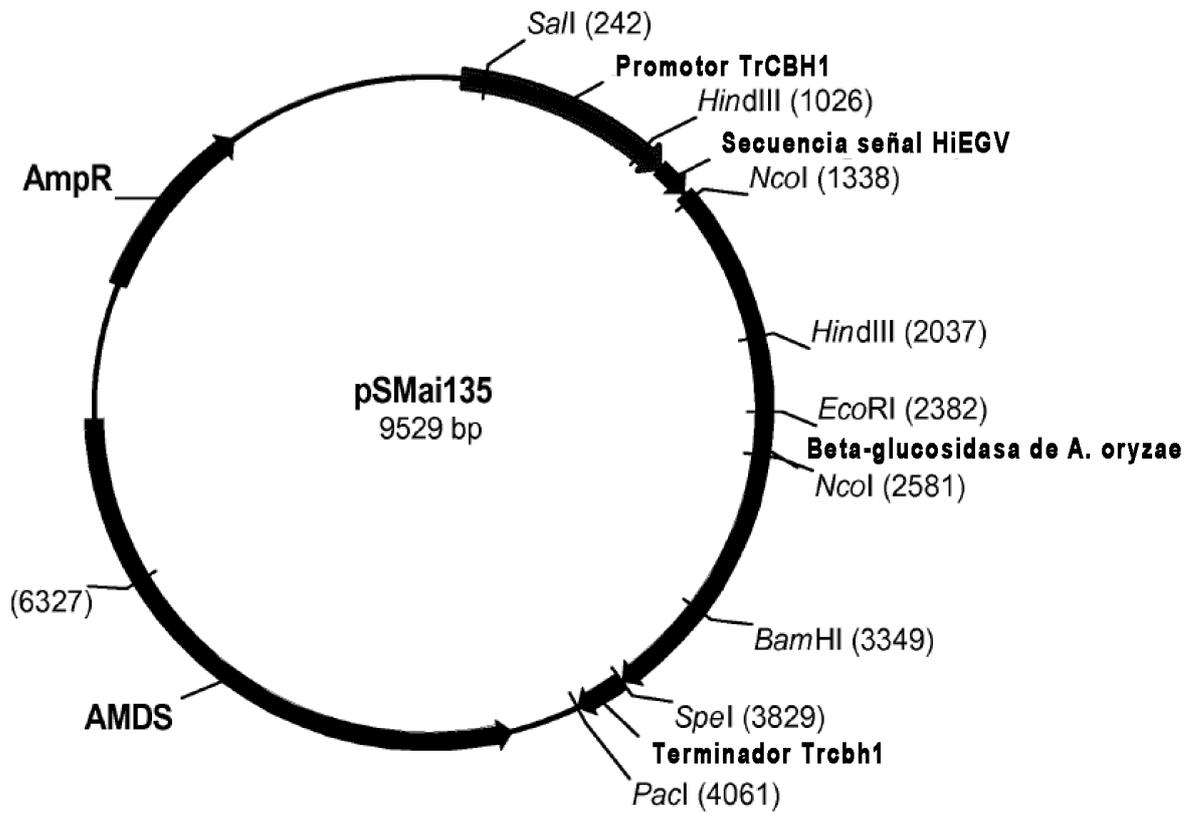


Fig. 10

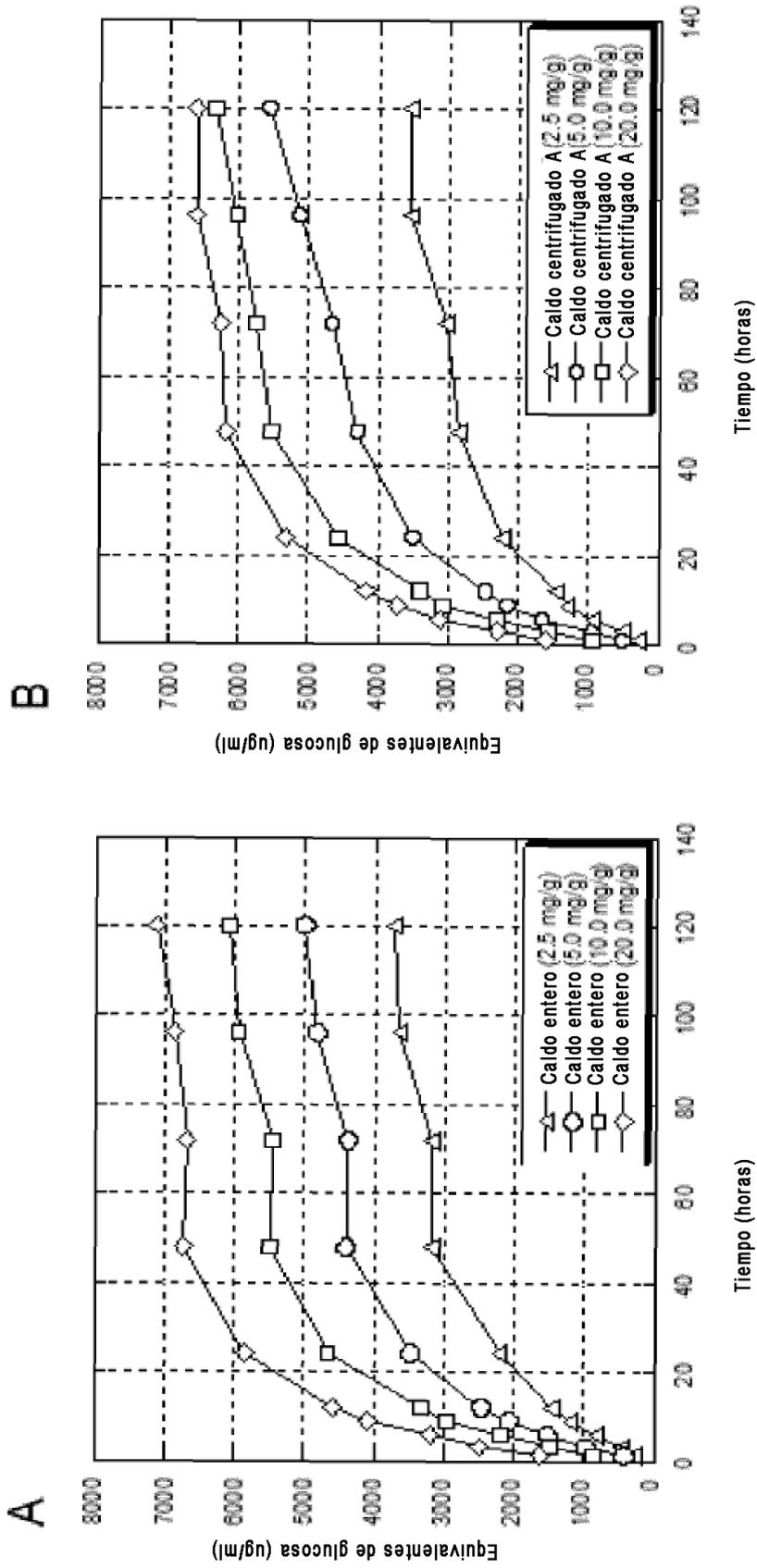


Fig. 11

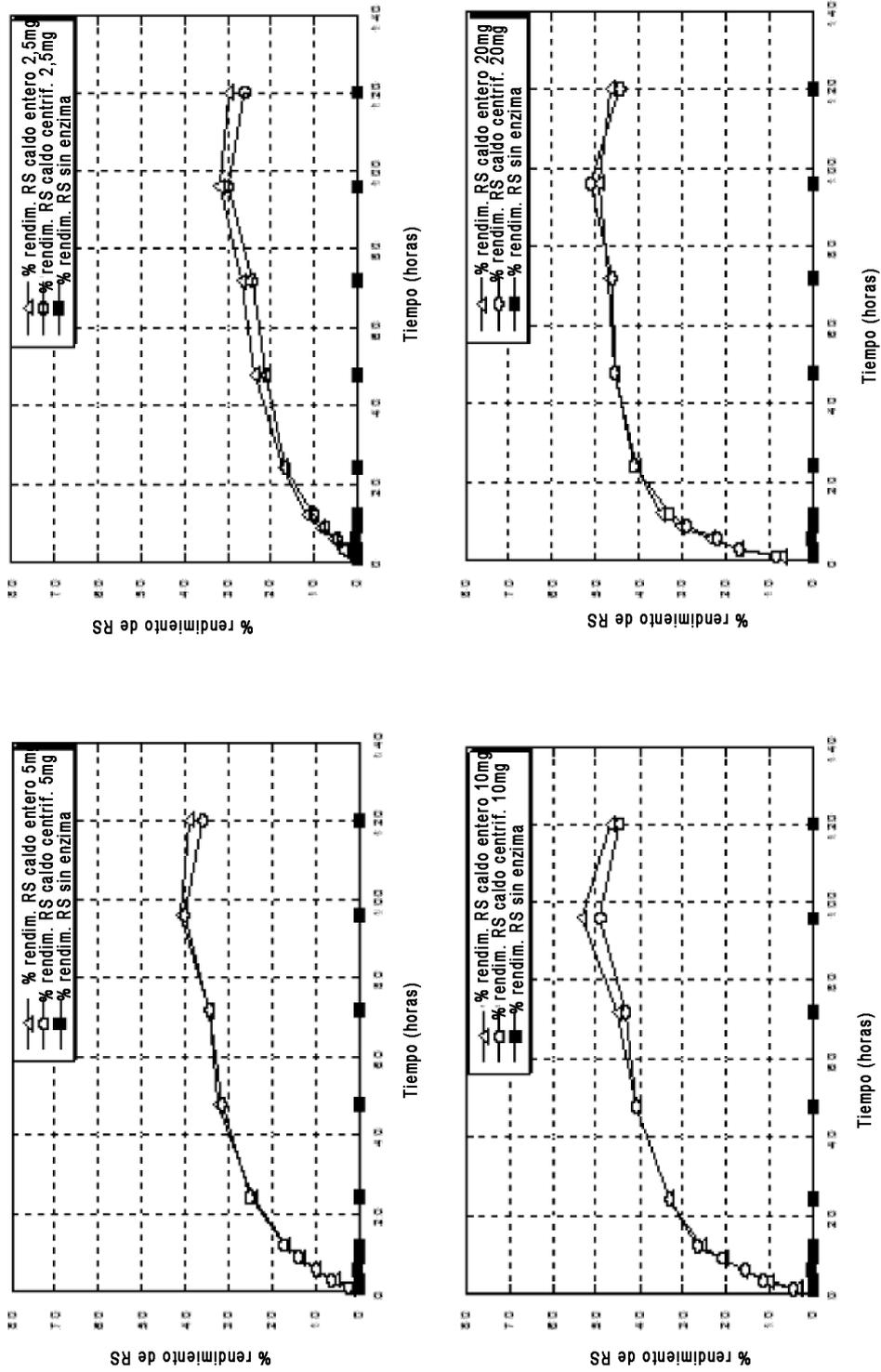


Fig. 12

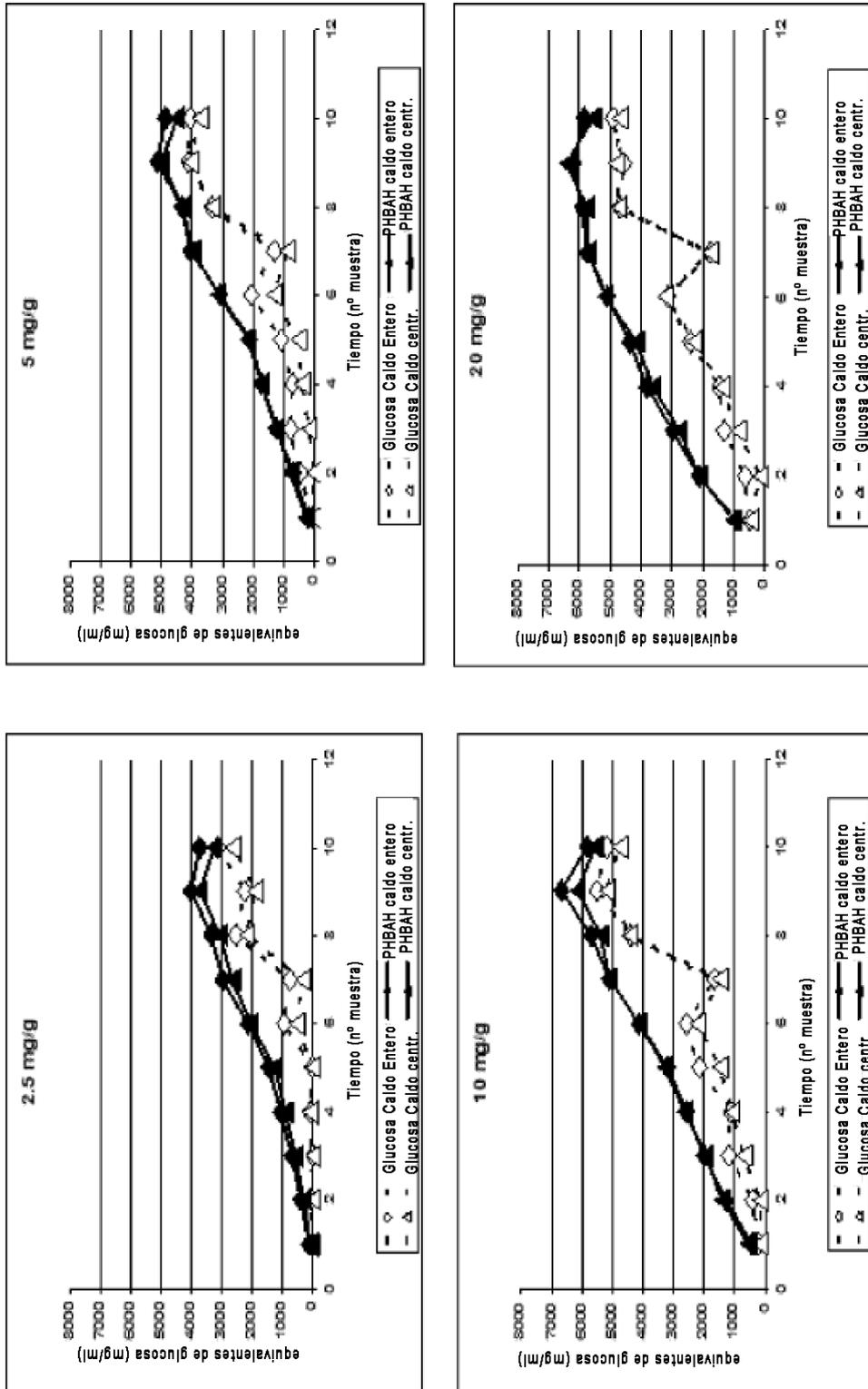


Fig. 13

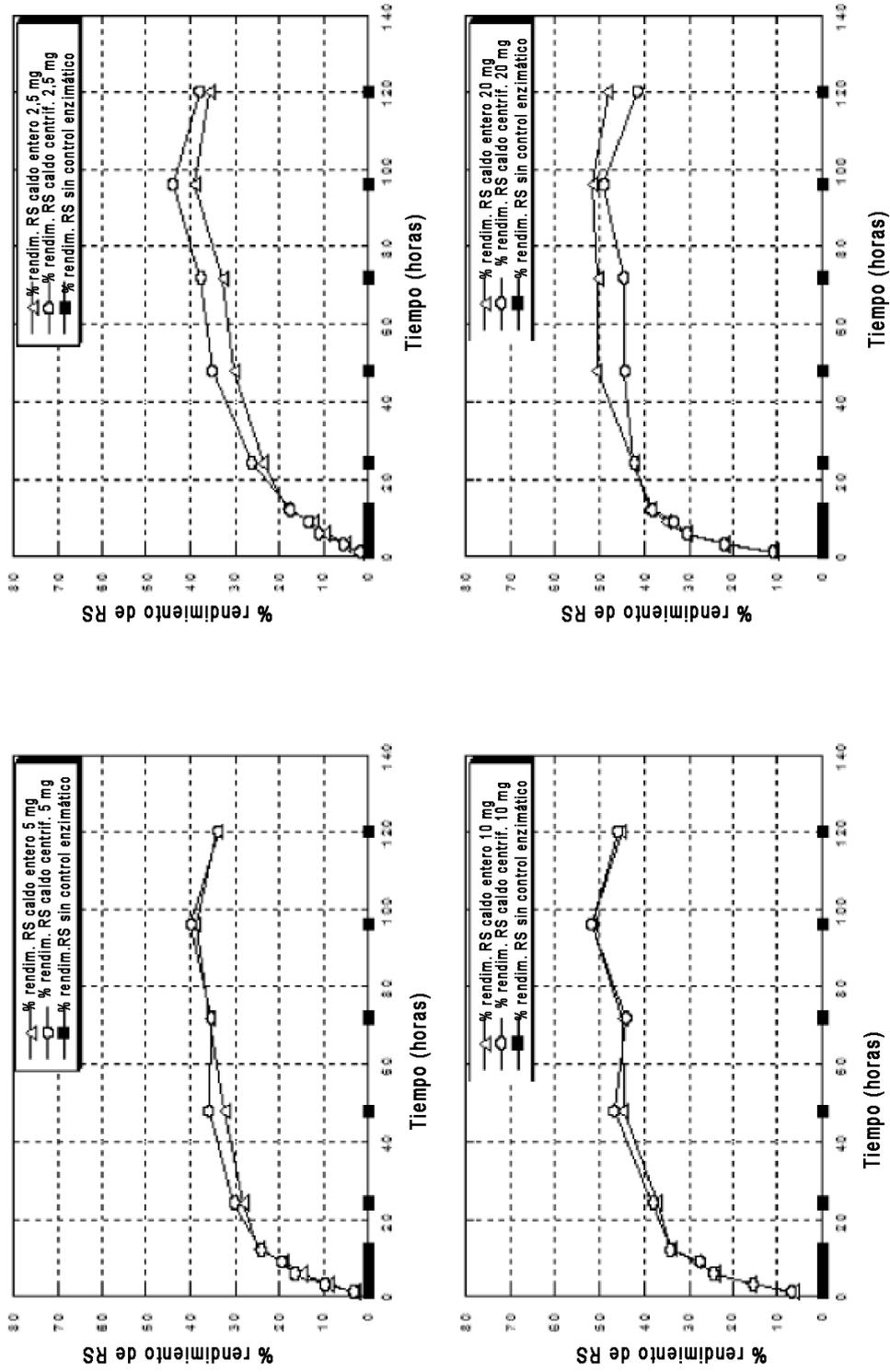


Fig. 14

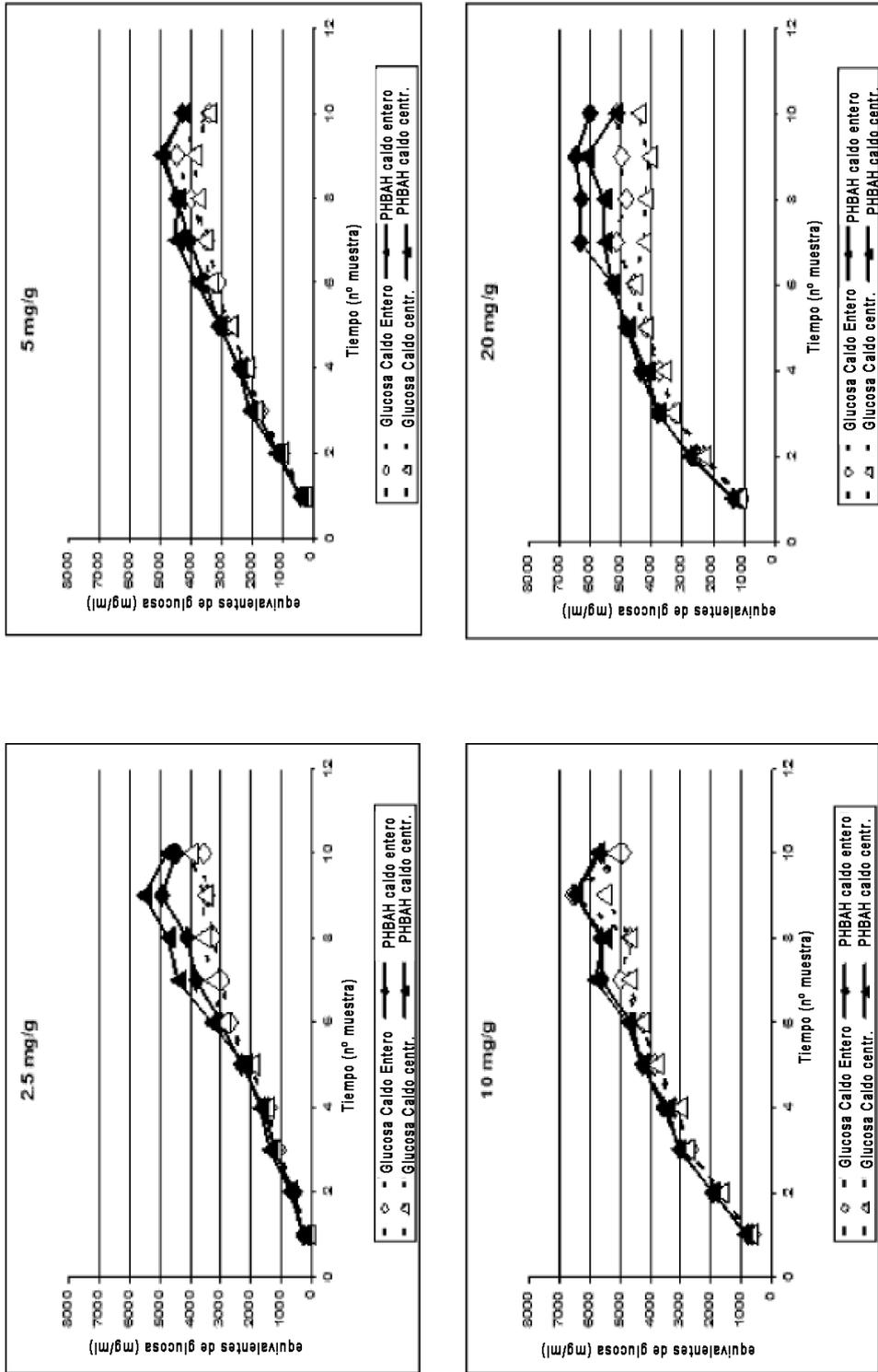


Fig. 15

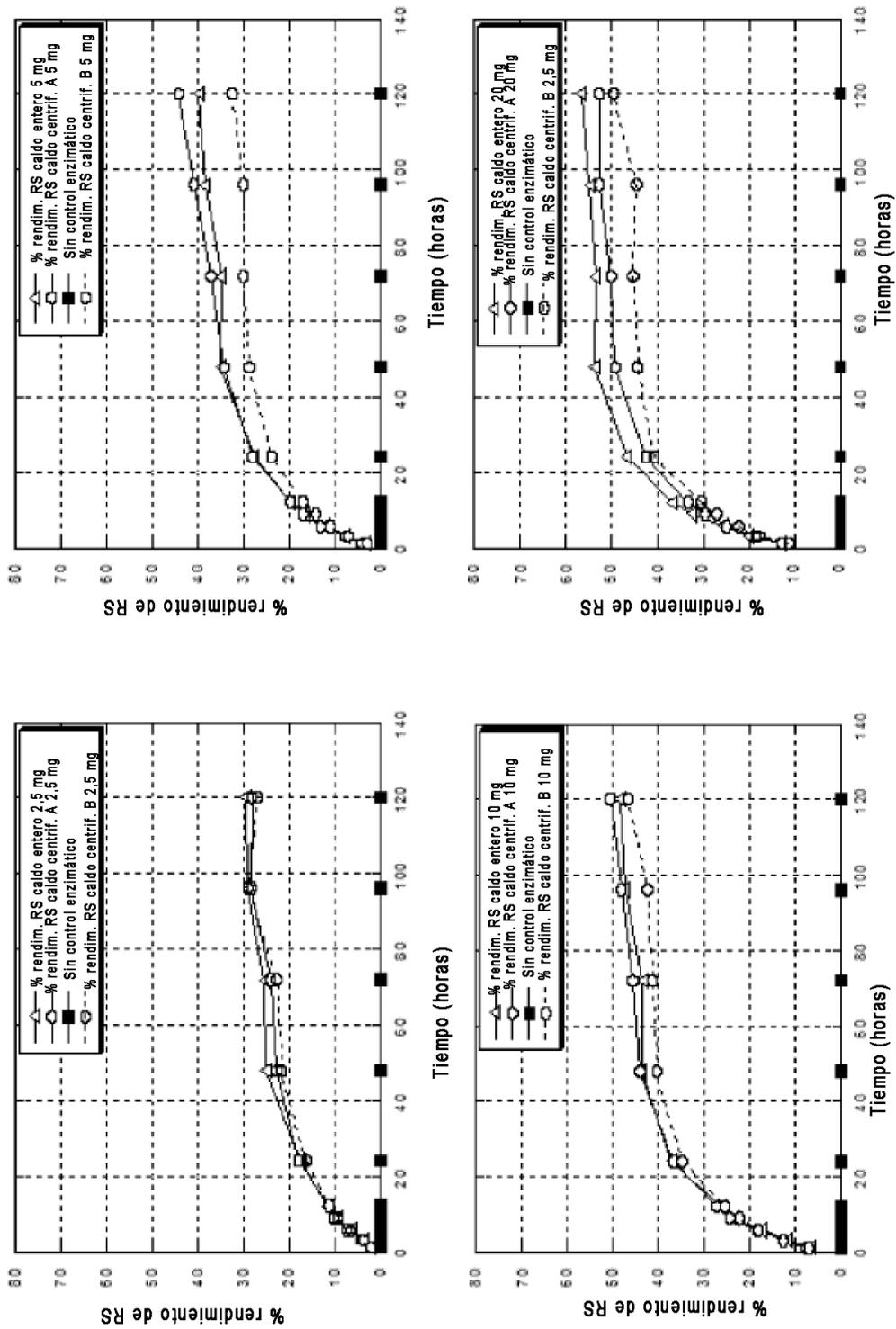
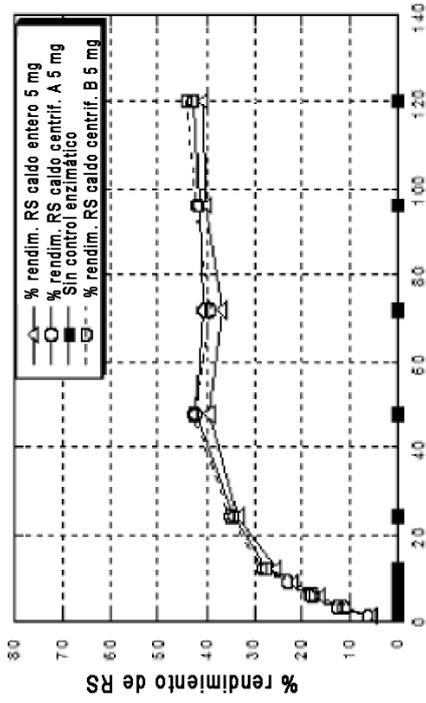
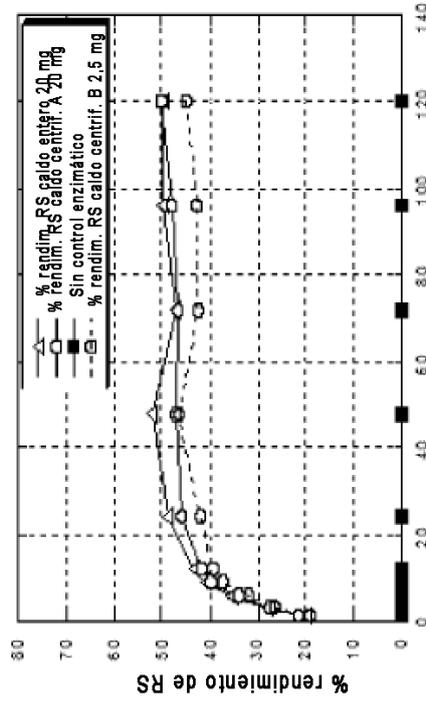


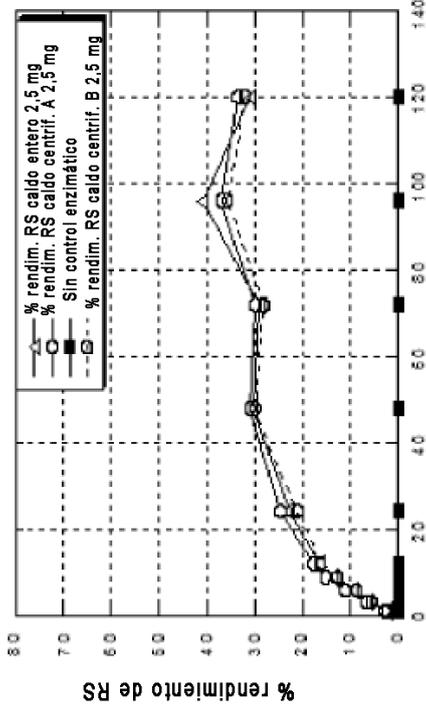
Fig. 16



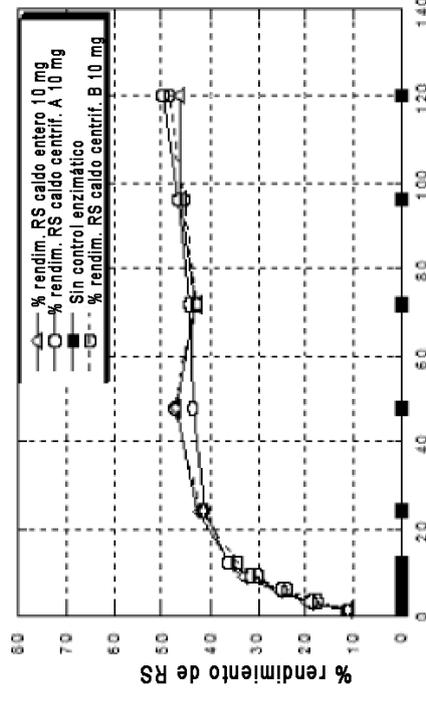
Tiempo (horas)



Tiempo (horas)



Tiempo (horas)



Tiempo (horas)

Fig. 17