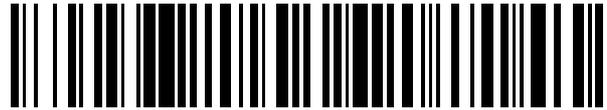


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 322**

21 Número de solicitud: 201630658

51 Int. Cl.:

C12N 1/15 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.12.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070339

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Célula hospedadora Myceliophthora thermophila con actividad celulolítica mejorada y composiciones enzimáticas obtenidas por la misma**

ES 2 647 322 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 322**

21 Número de solicitud: 201630658

57 Resumen:

Célula hospedadora *Myceliophthora thermophila* con actividad celulolítica mejorada y composiciones enzimáticas obtenidas por la misma.

La presente invención se refiere a una célula hospedadora, preferiblemente una célula de *Myceliophthora thermophila*, que muestra una menor expresión y/o secreción de enzimas celulolíticas no contributivas, preferiblemente donde la enzima celulolítica no contributiva es la endoglucanasa 6 que comprende la SEQ ID NO: 2, favoreciendo así la presencia de enzimas celulolíticas contributivas en el cóctel enzimático sintetizado por dicha célula hospedadora. La presente invención también se refiere al uso de dichas células hospedadoras y de los cócteles enzimáticos sintetizados por dichas células hospedadoras para la obtención de azúcares fermentables de la biomasa y un procedimiento para producir bioproductos, preferiblemente bioetanol, que comprende el uso de dicha célula hospedadora o de la composición de la invención.

Célula hospedadora *Myceliophthora thermophila* con actividad celulolítica mejorada y composiciones enzimáticas obtenidas por la misma

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere al campo de los bioproductos, preferiblemente biocombustibles, y más particularmente, a la mejora de cócteles celulolíticos producidos por células hospedadoras modificadas que expresen y/o secreten una menor diversidad de enzimas celulolíticas, a los cócteles enzimáticos obtenidos de dichas células hospedadoras, y al uso de dichas células hospedadoras y dichos cócteles enzimáticos en la producción de bioproductos, preferiblemente bioetanol, a partir de biomasa.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

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

20

La biomasa vegetal proporciona una fuente completa de energía potencial en forma de azúcares que se puede utilizar para numerosos procesos industriales y agrícolas, y es por tanto un recurso renovable significativo para la generación de azúcares fermentables que pueden dar como resultado productos finales comercialmente valiosos, tales como los biocombustibles. Sin embargo, la enorme energía potencial de estos hidratos de carbono está actualmente infrutilizada porque los azúcares están formando parte de polímeros complejos que no están fácilmente accesibles para la fermentación.

25

30

Cualquier biomasa vegetal se puede considerar como materia prima para la producción de biocombustibles como pueden ser cultivos herbáceos, otros restos agrícolas o incluso residuos sólidos urbanos. Estos materiales comprenden principalmente celulosa y hemicelulosa. Una vez que la celulosa y la hemicelulosa se convierten en glucosa y xilosa, respectivamente por medio de un proceso de hidrólisis enzimática, éstos compuestos son fácilmente fermentados por otros organismos a etanol. De esta manera, cuánta más cantidad de azúcares complejos permanezca al final del proceso hidrolítico, menor será el rendimiento de la producción de etanol al final del proceso de la fermentación. Por tanto, un área de investigación destinada a disminuir los costes y a potenciar el rendimiento de los procedimientos de producción de biocombustible se centra en la mejora de la eficiencia de

35

las enzimas celulolíticas, así como de los cócteles enzimáticos que comprenden dichas enzimas y que se pueden utilizar para generar azúcares fermentables a partir de biomasa.

Debido a la complejidad de la biomasa, su conversión en azúcares monoméricos implica la acción de diversos tipos de enzimas con diversas actividades enzimáticas, que digieren celulosa, hemicelulosa, así como otros polímeros complejos presentes en la biomasa. Después de la celulosa, la hemicelulosa es la segunda fracción más abundante disponible en la naturaleza. Tanto la celulosa como la hemicelulosa se pueden tratar previamente, de forma mecánica, química, enzimática o de otros modos, para aumentar su susceptibilidad a la hidrólisis. Tras este proceso de pretratamiento tiene lugar una etapa de sacarificación, que es un proceso enzimático por el cual los hidratos de carbono complejos se degradan en sus componentes monosacáridos. El objetivo de cualquier tecnología de sacarificación es alterar o eliminar los impedimentos estructurales y de composición para la hidrólisis con el fin de mejorar la tasa de hidrólisis enzimática y aumentar los rendimientos de azúcares fermentables a partir de la biomasa, que comprende principalmente, celulosa y hemicelulosa (N. Mosier y col., 2005, *Bioresource Technology* 96, 673–686). Después de esta etapa de sacarificación se realiza un proceso de fermentación.

Las enzimas individuales han demostrado digerir solo parcialmente la celulosa y la hemicelulosa y, por tanto, se necesita la acción concertada de todas o al menos varias de las enzimas denominadas “celulasas o enzimas celulolíticas” para completar la conversión de los diferentes polímeros complejos, específicamente, celulosa y hemicelulosa, a azúcares monoméricos. Las celulasas (1,4-beta-D-glucano-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.4) comprenden al menos tres actividades enzimáticas, endo- β -glucanasas (EC 3.2.1.4), exo- β -glucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), de las que se ha demostrado su actuación sinérgica en la hidrólisis de la celulosa (Woodward, J. 1991, *Bioresource Technology* Vol 36, pág. 67-75). Además de estas tres actividades hoy en día se reconocen otras de igual relevancia tales como, xilanasas (E.C. 3.2.1.8), beta-xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) y polisacárido mono-oxigenasas (también denominadas, PMO, AA9, glicosilhidrolasa de la familia 61 o GH61).

La eficacia hidrolítica de un complejo multienzimático, formado por una amplia diversidad de enzimas celulolíticas, en el proceso de sacarificación celulósica depende tanto de las propiedades de las enzimas individuales como de la relación de cada enzima en el complejo.

Por consiguiente, las celulasas se han convertido en biocatalizadores debido a su naturaleza compleja y a sus extensas aplicaciones industriales. Hoy en día se presta una considerable atención a la producción de celulasas y a los avances en la investigación, especialmente en la dirección de la mejora de la economía del proceso de varias industrias, con el fin de

5 obtener composiciones enzimáticas que presenten una mayor actividad y mejores propiedades celulolíticas. Así, la mayoría de los esfuerzos en el presente campo técnico han ido dirigidos a la generación de microorganismos que expresan cócteles enzimáticos mejorados gracias a la sobreexpresión de uno o más genes que codifican para enzimas celulolíticas específicas, pudiendo ser dichos genes tanto homólogos como heterólogos.

10 Esta sobreexpresión se puede producir por cualquier método conocido en la técnica, siendo uno de ellos la expresión bajo el control de fuertes señales de expresión, lo que da lugar a una mayor producción de esa o esas enzimas dentro del cóctel enzimático (US20080194005A1). Se han dado a conocer en el estado de la técnica numerosas células hospedadoras utilizadas para la expresión de genes heterólogos, tales como la bacteria

15 *Escherichia coli*, y sus procedimientos de transformación. En este contexto, se han desarrollado también numerosos sistemas fúngicos de expresión, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, entre otros. Sin embargo, por diversos motivos, muchos de estos microorganismos recombinantes no han encontrado amplia aceptación o uso. Entre los microorganismos recombinantes que se utilizan en la actualidad

20 para la producción de proteínas o enzimas, destacan los de los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*,

25 *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* o *Xylaria*.

30 En términos generales, una célula hospedadora productora de un cóctel celulolítico ideal debe cumplir un gran número de criterios, tales como, utilizar el medio eficientemente, producir el polipéptido(s) o la proteína(s) de interés con un elevado rendimiento, en su caso ser capaz de secretar la(s) proteína(s) o el polipéptido(s) o las composiciones enzimáticas, de forma eficiente, poder utilizar una amplia gama de elementos reguladores de la expresión

35 asegurando de esta manera una fácil aplicación y versatilidad, permitir el uso de marcadores fácilmente detectables que sean baratos de usar, y producir transformantes estables.

En definitiva, es deseable generar microorganismos que expresen un cóctel enzimático óptimo que mejore el rendimiento y eficiencia del proceso de degradación de la biomasa. Sería deseable además, de cara a mejorar la economía del proceso, que el cóctel enzimático óptimo o mejorado permitiera el uso de una menor cantidad de enzimas dentro del cóctel, para la obtención de los mismos, o mejorados, rendimientos de producción de azúcares fermentables en dichos procesos de degradación de la biomasa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 La presente invención describe una célula hospedadora modificada capaz de secretar una composición enzimática optimizada que presenta una mayor capacidad celulolítica respecto a la composición obtenida por la célula parental o silvestre no modificada.

La modificación llevada a cabo en la célula hospedadora de la invención va dirigida a disminuir la expresión y/o secreción de al menos una, o más de una, de las enzimas celulolíticas que expresa homológamente dicha célula hospedadora y que forma(n) parte de la composición enzimática que expresa y secreta dicha célula, con la condición de que la(s) enzima(s) celulolítica(s) de las que se disminuye su expresión y/o secreción son aquellas enzimas celulolíticas que presentan una menor actividad celulolítica en relación a la actividad celulolítica que presentan otras enzimas celulolíticas de su misma familia incluidas en el cóctel.

Las condiciones industriales en las que se emplean los cócteles enzimáticos son más bien controladas y predefinidas, respecto a las condiciones ambientales en las que se encuentran los organismos que los producen. Por dicho motivo, para llevar a cabo la hidrólisis de biomasa a escala industrial no es necesaria la presencia de una amplia diversidad enzimática, que se traduzca en actividades enzimáticas redundantes, que no mejoran los rendimientos del proceso, ya que en las condiciones de reacción industrial sólo unas pocas de las enzimas celulolíticas van a ser capaces de contribuir a la eficiencia de la reacción. La expresión del resto de enzimas redundantes y con limitada actividad celulolítica en esas condiciones industriales es por tanto indeseable. Por este motivo, en la presente invención, con menor número de enzimas ineficientes (en adelante, enzimas o celulasas “no contributivas”) y mayor proporción de las eficientes (en adelante, enzimas o celulasas “contributivas”), se consigue mejorar el rendimiento y la eficiencia del proceso de degradación de la biomasa en comparación de otros cócteles con mayor diversidad pero menor eficiencia. Esta mayor eficiencia se refiere al uso de una menor diversidad de

enzimas en el cóctel enzimático, para la obtención de mejores rendimientos (mayor producción de azúcares fermentables, tales como glucosa) en dichos procesos de degradación de la biomasa.

5 Por tanto, desde un punto de vista económico de los procesos industriales de degradación de biomasa en los que se utiliza la composición enzimática descrita en la presente invención, dicha composición permite obtener mejores rendimientos con una menor diversidad de enzimas en el cóctel enzimático, de manera que se incrementa la eficiencia del proceso de degradación de la biomasa, ya que hay una mayor representación de las
10 enzimas contributivas (Figura 1).

El objetivo de la presente invención es reducir dicha diversidad enzimática mediante la reducción de la expresión y/o secreción de una o varias enzima(s) celulolítica(s) que presenta(n) una menor eficiencia celulolítica respecto a la que muestran otras enzimas
15 celulolíticas de su misma familia dentro del cóctel, para así obtener una composición enzimática que presente una mayor concentración de aquellas enzimas celulolíticas que tienen una mayor eficiencia y muestren un incremento en la eficiencia del proceso de degradación de biomasa.

20 Otra de las ventajas obtenidas con las células hospedadoras de la invención y con las composiciones enzimáticas obtenidas a partir de dichas células hospedadoras de la invención, es que, puesto que dichas composiciones comprenden la(s) enzima(s) celulolítica(s) que presenta(n) una mayor eficiencia celulolítica, es necesario una menor diversidad de enzima(s) en la composición enzimática de la invención, para la obtención de
25 mejores rendimientos de producción de azúcares fermentables en comparación con los que se obtienen utilizando otras composiciones conocidas que presentan una amplia diversidad enzimática y descritas en el estado de la técnica para el mismo fin.

Por lo tanto, la presente invención representa una solución a la necesidad de proporcionar
30 un microorganismo que exprese una mezcla o cóctel de enzimas celulolíticas optimizado, capaz de mejorar la eficiencia del proceso celulolítico de la biomasa o sacarificación, mediante la disminución de la expresión y/o secreción de enzimas celulolíticas no contributivas que tienen una menor eficiencia respecto a otras enzimas celulolíticas contributivas y, como consecuencia, se necesita una menor diversidad enzimática o en el
35 cóctel enzimático que comprende enzimas contributivas, para obtener mejores rendimientos mejores rendimientos (mayores cantidades de azúcares fermentables liberados). Así, la

composición enzimática expresada y/o secretada por las células hospedadoras modificadas de la invención presenta una mayor eficiencia celulolítica y una mayor concentración de enzimas celulolíticas contributivas que se seleccionan de aquellas que presentan una mayor eficiencia celulolítica dentro del grupo de enzimas que forman parte de la diversidad enzimática del cóctel. Esta mayor concentración de enzimas celulolíticas contributivas en la composición enzimática de la invención es consecuencia de la menor expresión y/o secreción de las enzimas celulolíticas no contributivas, ya que las enzimas celulolíticas contributivas ocupan el espacio dejado, en términos de cantidad presente en la composición enzimática, por las enzimas no contributivas eliminadas (Figura 1).

10

Así, la presente invención describe una célula hospedadora modificada que produce un cóctel enzimático menos diverso, al presentar una expresión y/o secreción reducida de al menos una enzima celulolítica no contributiva respecto a la expresión de la misma enzima celulolítica no contributiva en una célula hospedadora parental o silvestre (*wild-type*) o no modificada. Adicionalmente, la célula hospedadora modificada de la invención presenta una eficiencia celulolítica mayor, de transformación del material celulósico en azúcares fermentables, que una célula hospedadora parental o silvestre, no modificada genéticamente.

15

Dicha célula hospedadora modificada, según se define en la presente invención, puede presentar adicionalmente un incremento en la expresión de al menos una enzima celulolítica contributiva respecto a la expresión de dicha(s) enzima(s) celulolítica(s) contributiva(s) en una célula hospedadora silvestre, no modificada genéticamente. La(s) enzima(s) celulolítica(s) contributiva(s) cuya expresión puede estar incrementada en la célula hospedadora de la invención, puede(n) seleccionarse, preferentemente entre enzima(s) celulolítica(s) contributiva(s) homóloga(s) y/o enzima(s) celulolítica(s) contributiva(s) heteróloga(s).

25

Los inventores han demostrado que una menor expresión y/o secreción de enzimas celulolíticas no contributivas en células hospedadoras, da lugar a la expresión y/o secreción de una composición enzimática que presenta un incremento en la concentración (o una mayor representación) de enzimas celulolíticas contributivas que tienen una mayor eficiencia que las enzimas celulolíticas no contributivas, lo que se traduce en el uso de una menor diversidad de enzimas celulolíticas en los procesos industriales de degradación de biomasa y, por lo tanto, también en un incremento en la eficiencia del proceso de sacarificación y, finalmente, en el rendimiento global de los procesos de producción de bioproductos,

35

preferiblemente biocombustible, ya que, como se ha mencionado previamente, se necesita una menor diversidad enzimática para obtener una mayor producción de azúcares fermentables al final del proceso de hidrólisis o sacarificación.

5 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención está relacionado con una célula hospedadora modificada que presenta una expresión y/o secreción reducida de al menos un 10% en al menos una de las enzimas celulolíticas no contributivas respecto al porcentaje de expresión y/o secreción de dicha enzima celulolítica no contributiva en una célula hospedadora parental o silvestre (*wild-type*). A partir de este momento y a lo largo del
10 presente documento, a este primer aspecto de la invención se le denominará “célula hospedadora de la invención”.

En algunas realizaciones preferidas, la célula hospedadora de la invención ha sido genéticamente modificada para reducir la expresión y/o secreción de al menos una enzima
15 celulolítica no contributiva en aproximadamente al menos un 1%, aproximadamente al menos un 2%, aproximadamente al menos un 3%, aproximadamente al menos un 4%, aproximadamente al menos un 5%, aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 15%, aproximadamente al menos un 20%, aproximadamente al menos un 25%,
20 aproximadamente al menos un 30%, aproximadamente al menos un 35%, aproximadamente al menos un 40%, aproximadamente al menos un 45%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 55%, aproximadamente al menos un 60%, aproximadamente al menos un 65%, aproximadamente al menos un 70%, aproximadamente al menos un 75%, aproximadamente al menos un 80%, aproximadamente al menos un 85%, aproximadamente al menos un 90%, aproximadamente al menos un 95%, aproximadamente al menos un
25 100% respecto a la expresión de dichas enzimas celulolíticas no contributivas en una célula hospedadora parental o silvestre. En una realización más preferida, la célula hospedadora de la invención presenta una reducción de un 100% de la expresión y/o secreción de al menos una enzima celulolítica no contributiva respecto a una célula hospedadora parental o silvestre.

30 A efectos de la presente invención, los términos “célula hospedadora parental o silvestre” o “célula hospedadora *wild-type*”, se pueden utilizar indistintamente y se refieren a aquella célula hospedadora que no ha sido modificada para presentar una expresión y/o secreción reducida de una o más de una enzima celulolítica no contributiva según se describe en la
35 presente invención. Preferiblemente, la célula parental o silvestre de la presente invención es *Myceliophthora thermophila*, más preferentemente *M. thermophila* C1.

En realizaciones particulares, las células hospedadoras se modifican para deleccionar, inhibir total o parcialmente, o silenciar total o parcialmente, secuencias codificantes de enzimas celulolíticas no contributivas o, de otro modo, eliminar, total o parcialmente, la expresión de una o más enzimas celulolíticas no contributivas.

5

Adicionalmente, las células hospedadoras de la invención, además de presentar una expresión y/o secreción reducida de al menos una enzima celulolítica no contributiva, pueden sufrir otras modificaciones genéticas con la finalidad de presentar características que mejoran la secreción de proteínas, estabilidad de proteínas u otras propiedades deseables para la expresión y/o secreción de una o más enzimas celulolíticas contributivas.

10

En una realización preferente, la expresión y/o secreción de una o más celulasas no contributivas se disminuye, reduce o inhibe total o parcialmente, lo que conduce a una mayor representación de las celulasas de interés, que en la presente invención se refieren, preferentemente, a las enzimas celulolíticas contributivas, en el cóctel enzimático obtenido a partir de dicha célula.

15

La modificación genética de la célula de la invención puede lograrse por técnicas de ingeniería genética o usando técnicas microbiológicas clásicas tales como mutagénesis química o UV y posterior selección. Puede usarse una combinación de modificación recombinante y técnicas de selección clásicas para producir el organismo de interés. Usando tecnología recombinante, las moléculas de ácidos nucleicos pueden introducirse, deleccionarse, disrupirse, silenciarse, inhibirse o modificarse, de un modo que se produce una expresión reducida o nula de la /s enzima/s celulolíticas no contributivas, lo que lleva asociado un elevado rendimiento de la secreción de las enzimas celulolíticas contributivas dentro del organismo o en el cultivo. En un enfoque de ingeniería genética, la recombinación homóloga puede usarse para inducir modificaciones de genes elegidos como diana eligiendo específicamente como diana un gen *in vivo* para suprimir la expresión de la proteína codificada. En un enfoque alternativo también puede usarse ARNi antisentido para disminuir o inhibir la expresión génica. Así en una realización preferida, las células hospedadoras de la invención se modifican para eliminar al menos un gen que codifica una celulasa no contributiva o de manera alternativa, disminuir o eliminar la expresión de una o más celulasas no contributivas. En algunas realizaciones, la expresión de una o más celulasas no contributivas se disminuye, inhibe, silencia o delecciona para aumentar la producción o la presencia en el cóctel enzimático secretado por la célula hospedadora modificada, de otras celulasas de interés, tales como las celulasas contributivas.

20

25

30

35

En otra realización preferida, la secreción de una o más celulasas no contributivas puede verse inhibida, disminuida o anulada. Alteraciones en la secreción de las enzimas celulolíticas en la célula hospedadora de la invención, pueden afectar tanto a la secreción de la(s) celulasa(s) no contributiva(s) como al sistema de secreción enzimática general que de forma específica inhibe, disminuye o anula la secreción de la(s) celulasa(s) no contributiva(s). Usando tecnología recombinante, las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido señal o secuencias que permiten la secreción de la o las enzimas celulolíticas no contributivas pueden introducirse, delecionarse, disrumpirse, silenciarse, modificarse, inhibirse, de modo que se produce una secreción disminuida o nula de la o las enzimas celulolíticas no contributivas. En un enfoque de ingeniería genética, la recombinación homóloga puede usarse para inducir modificaciones en el sistema de secreción de la o las enzimas celulolíticas no contributivas. Así, en una realización preferida, las células hospedadoras de la invención se modifican para disminuir o anular la secreción de al menos una celulasa no contributiva.

15

A efectos de la presente invención, el término “expresión” o “expresión génica” se refiere a la transcripción de un gen específico o genes específicos o construcción genética específica en ARNm con la posterior traducción de este último en una proteína. Adicionalmente incluye la secreción de la proteína hasta el exterior de la célula.

20

A efectos de la presente invención, el término “secreción” se refiere al transporte de una proteína desde el interior de la célula al exterior. A efectos de la presente invención, el término secreción hace referencia, preferentemente a la secreción de enzimas con actividad celulolítica, que por efecto de este transporte aparecen en el cóctel enzimático producido por dicha célula.

25

A efectos de la presente invención, los términos “aumento de la expresión” o “sobreexpresión” pueden utilizarse indistintamente a lo largo del presente documento y se refieren a cualquier forma de expresión que es adicional o mayor al nivel original de expresión en una célula parental o silvestre. Los métodos para aumentar la expresión de genes o productos génicos están bien documentados en la técnica e incluyen, por ejemplo, sobreexpresión conducida por promotores apropiados, el uso de potenciadores de la transcripción o potenciadores de la traducción. Los ácidos nucleicos aislados pueden servir también como promotores o potenciadores pudiendo introducirse en una posición apropiada de una forma no heteróloga de un polinucleótido con el fin de regular por incremento la expresión de un ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. Por ejemplo, los

30

promotores endógenos se pueden alterar *in vivo* por mutación, delección, y/o sustitución, o promotores aislados pueden introducirse en una secuencia polinucleotídica que codifique para un gen de interés para controlar la expresión del mismo. A efectos de la presente invención, se pretende que estos términos, abarquen el incremento en la expresión de
 5 enzimas tanto homólogas, como heterólogas. En algunas realizaciones, el incremento en la expresión incluye una tasa de transcripción elevada y/o un nivel del gen también elevado en comparación con la tasa de transcripción homóloga de dicho gen. En algunas otras realizaciones, un gen heterólogo se introduce en una célula hospedadora para inducir un incremento en la expresión de un gen que codifica una enzima homóloga. En algunas
 10 realizaciones, el gen heterólogo es un gen que ha sido modificado para incrementar la expresión del producto del gen. En algunas realizaciones, el término también abarca la secreción del polipéptido a partir de una célula.

A efectos de la presente invención, los términos “endógeno” u “homólogo” se refieren tanto a
 15 genes como a proteínas, que se encuentran de forma natural en una célula hospedadora, es decir, sin que exista ninguna intervención humana. Adicionalmente, dichos términos también hacen referencia a esos mismos genes o proteínas que una vez aislados del organismo pueden volver a reintroducirse (transgen) mediante ingeniería genética.

A efectos de la presente invención, el término “disminución”, “reducción”, “supresión”,
 20 “inhibición”, “delección”, “silenciamiento”, “eliminación”, se refieren a un descenso en el nivel de expresión de un gen y/o secreción de la proteína respecto al nivel original de expresión del mismo gen y/o secreción de la proteína en el genotipo parental o silvestre. A efectos de la presente invención, la disminución, eliminación, reducción, supresión, inhibición, delección,
 25 silenciamiento o inhibición, de la expresión y/o secreción en orden creciente de preferencia es de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%, reducida en comparación con la expresión en las células hospedadoras parentales o silvestres.

Una persona experta en la técnica conoce las diferentes herramientas y técnicas de rutina
 30 para la eliminación, reducción, supresión, delección, silenciamiento o inhibición de la expresión de un gen o proteína. A efectos de la presente invención, sirvan como ejemplo, la clonación de un gen o genes diana en forma de repetición invertida (en parte o totalmente), pérdida, sustitución o bloqueo de material genético que resulta en una interrupción completa
 35 o parcial de la secuencia del ADN que compone el gen, alteraciones del promotor o cualquier otra reducción del nivel de transcripción, alteración de la expresión de proteínas

reguladoras, silenciamiento génico (dsARN, siARN, etc.), modificación de la secuencia de iniciación de la traducción, alteración del marco de lectura, en su caso cambios en la secreción (alteraciones del péptido señal, etc.), mutagénesis, etc. En algunas realizaciones, el silenciamiento génico es preferido. En otras realizaciones, la supresión o eliminación
5 parcial del gen es preferida. En otras realizaciones, la supresión completa o casi completa de la secuencia del gen es preferida.

Un experto en la materia conoce las diferentes herramientas y técnicas de rutina para la eliminación, reducción, supresión o inhibición de la secreción de una proteína. A efectos de
10 la presente invención, sirvan como ejemplo la modificación genética dirigida o al azar de las secuencias señal (péptido señal) que permiten la secreción de una proteína o la modificación genética dirigida o al azar del sistema de secreción de la célula hospedadora en sí mismo. Las modificaciones genéticas pueden consistir en pérdida de regiones, modificaciones, sustituciones, integraciones, alteraciones, silenciamiento, alteración del
15 marco de lectura, etc.

Tal como se utiliza aquí, el término "recombinante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no se produce naturalmente en una célula huésped. En algunas realizaciones, las "células recombinantes" expresan genes que no se encuentran en forma
20 idéntica dentro de la forma nativa o silvestre (es decir, no recombinante) de la célula y/o expresan genes nativos que de otro modo su expresión se encontraría aumentada, disminuida o anulada debido a la intervención humana deliberada. Las células recombinantes contienen al menos un polinucleótido o polipéptido recombinante. Una construcción de ácido nucleico que comprende el propio ácido nucleico y los elementos
25 necesarios para su expresión, el ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido), célula o polipéptido se denominan aquí como "recombinante" cuando es de origen no natural, artificial o procesado.

El término "biomasa" se refiere en la presente invención a la fracción biodegradable de los
30 productos, residuos y restos de origen biológico procedentes de la agricultura (incluyendo sustancias vegetales, tales como residuos de cultivos, y sustancias animales), industrias forestales (tales como recursos madereros) e industrias relacionadas que incluyen pesquerías y acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y urbanos, tales como residuos sólidos urbanos o residuos de papel, y cultivos energéticos.
35 En una realización preferida, la biomasa es paja o la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. En una realización más preferida, la biomasa es biomasa vegetal, más

preferiblemente seleccionada a partir de la lista que consiste en: biomasa rica en azúcares fermentables, tales como caña de azúcar, biomasa de almidón, por ejemplo, granos de cereal, paja de maíz, paja de trigo, paja de cebada, paja de sorgo, paja de caña de azúcar, maleza, troncos, rama y hojas.

5

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

A efectos de la presente invención el término “celulosa” se refiere a un polisacárido lineal que comprende de cientos a miles de unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -(1,4). Este polisacárido se conoce también como β -(1,4) glucano.

El término “enzima celulolítica o celulasa” se refiere a una categoría de enzimas que pueden degradar polímeros complejos, tales como, celulosa y/o hemicelulosa (β -1,4-glucano o enlaces β -D-glucosídicos) a oligosacáridos más cortos, tales como, celobiosa y/o glucosa y xilobiosa y/o xilosa, respectivamente. Dentro de dicha categoría de enzimas se encuentran preferentemente los siguientes grupos: 1,4- β -D-glucano glucanohidrolasa (“endoglucanasa” o “EG”); 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa (“exoglucanasa”, “celobiohidrolasa”, o “CBH”); β -D-glucósidoglucanohidrolasa (“ β -glucosidasa”, “celobiasa” o “BGL”), endoxilanasas o xilanasas (“Xyl”), beta-xilosidasas (“beta-Xyl”) y polisacárido mono-oxigenasas (“PMO”). Las endoglucanasas rompen enlaces internos y alteran la estructura cristalina de la celulosa, exponiendo cadenas de polisacárido de celulosa individuales (“glucanos”). Las celobiohidrolasas acortan gradualmente las moléculas de glucano, liberando principalmente unidades de celobiosa (un dímero de glucosa ligado en β -1,4 soluble en agua), además de glucosa, celotriosa y celotetraosa. Las β -glucosidasas fraccionan celobiosa en monómeros de glucosa. Las xilanasas catalizan la hidrólisis aleatoria de xilano polimérico, pectina

35

polimérica o hemicelulosa que contiene residuos xilosa que da como resultado la formación de oligómeros de azúcar que contienen xilosa y/o residuos xilosa monoméricos. Las beta-xilosidasas son enzimas con actividad 4- β -D-xilano xilohidrolasa catalizando la reacción desde los oligómeros de xilosa, incluso xilobiosa, liberando finalmente D-xilosa. Las PMO
5 son metaloproteínas con actividad endocelulolítica que actúan con un mecanismo diferente al que realizan las endoglucanasas, ya que rompen las cadenas de celulosa por oxidación de sus monómeros de glucosa en los carbonos 1, 4 y/o 6.

El término “eficiencia” de una enzima, grupo de enzimas o composición enzimática, se
10 refiere a la actividad catalítica de la enzima, grupo de enzimas o composición enzimática, en condiciones apropiadas en las que la enzima convierte sustratos poliméricos o artificiales específicos en productos oligoméricos o monoméricos específicos. Preferiblemente, una “mayor eficiencia” o “mejor eficiencia” de las enzimas de la invención o del cóctel enzimático de la invención, se refiere a la obtención de una igual, o preferiblemente mayor cantidad de
15 azúcares fermentables obtenidos al final del proceso hidrolítico (es decir, un igual o mayor rendimiento), con una menor diversidad de enzimas celulolíticas presentes en el cóctel, con respecto a un cóctel enzimático obtenido de una célula hospedadora silvestre o parental.

El término “enzimas celulolíticas contributivas” se refiere a aquellas celulasas dentro de la
20 diversidad de celulasas presentes en los cócteles enzimáticos, tales como preferentemente, endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas, β -xilosidasas, xilanasas, polisacárido mono-oxigenasas, entre otros, que presentan una actividad celulolítica tal que al ser eliminada de un cóctel enzimático se reduce el rendimiento en términos de liberación de azúcares fermentable por unidad de masa. En una realización preferida, una enzima
25 celulolítica contributiva de cualquiera de las familias o actividades celulolíticas descritas en la presente invención, puede seleccionarse de entre una celulasa homóloga o heteróloga.

El término “enzima celulolítica no contributiva” se refiere a aquellas celulasas dentro de la
diversidad de las celulasas presentes en los cocteles enzimáticos, tales como
30 preferentemente, endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas, β -xilosidasas, xilanasas, polisacárido mono-oxigenasas, entre otros, que presentan una actividad celulolítica tal que al ser eliminada o reducida de un cóctel enzimático se mejora la eficiencia del mismo. En una realización preferida, una enzima celulolítica no contributiva de cualquiera de las familias o actividades celulolíticas descritas en la presente invención,
35 puede seleccionarse preferentemente de entre una celulasa homóloga, o heteróloga. En una realización preferida, la celulasa no contributiva de la invención es una celulasa homóloga.

El término “celobiohidrolasa”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína de la clase E.C. 3.2.1.91, que cataliza la hidrólisis de la celulosa polimérica a celobiosa mediante una actividad exoglucanasa, liberando secuencialmente moléculas de celobiosa desde los extremos reductores o no reductores de la celulosa.

5

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

10 El término “beta-glucosidasa”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de enzimas celulasas clasificadas como EC 3.2.1.21. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de oligómeros de azúcar, incluyendo, pero sin limitarse al dímero de glucosa o celobiosa, con la liberación de un monómero de azúcar correspondiente, utilizada, pero sin limitarse, para la síntesis de etanol. La enzima beta-glucosidasa actúa sobre los enlaces β -
15 (1,4) que unen a dos moléculas de glucosa o glucosa sustituida (es decir, el disacárido celobiosa). Es una exocelulasa con especificidad por una variedad de sustratos de beta-D-glucósido. Cataliza la hidrólisis de residuos no reductores terminales en beta-D-glucósidos con liberación de glucosa.

20 Los términos “endoxilanasas” o “xilanasas” tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a un grupo de enzimas (EC 3.2.1.8) que catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también puede denominarse endo-1,4- β -xilanasas o 1,4- β -D-xilano xilanohidrolasa.

25 El término “beta-xilosidasa” tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de enzimas (EC 3.2.1.37) que cataliza la hidrólisis de 1,4- β -D-xilanos, para eliminar residuos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores. Esta enzima también puede denominarse xilano 1,4- β -xilosidasa, 1,4- β -D-xilano xilohidrolasa, exo-1,4- β -xilosidasa o xilobiasa.

30

Los términos “polisacárido monooxigenasa”, “PMO”, “Glicosil-hidrolasa de la familia 61” o “GH61” o “AA9” se refieren a un grupo de enzimas, originalmente clasificadas dentro de la familia de proteínas GH61, ya que presentan actividad GH61 o PMO, y que al ser incluidas en una reacción de sacarificación resulta en una mayor cantidad (mayor rendimiento) de uno
35 o más azúcares solubles (por ejemplo, glucosa) en comparación con la reacción de sacarificación llevada a cabo bajo las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína

GH61. Los miembros de esta familia de enzimas actúan como monooxigenasas de cobre que catalizan la rotura de las cadenas de celulosa mediante un mecanismo oxidativo a nivel de varios carbonos (C1, C4 y/o C6), liberando celodextrinas (Langston et al. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77:7007-7015).

5

El término "identidad" y "% identidad" se refieren a la proporción de residuos de ácidos nucleicos o aminoácidos que son idénticos entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos que se están comparando. Se puede determinar el grado de identidad mediante el método de Clustal, el método de Wilbur-Lipman, el programa GAG, que incluye
10 GAP, BLAST o BLASTN, EMBOSS Needle y FASTA. Además, se puede utilizar el algoritmo de Smith Waterman con el fin de determinar el grado de identidad entre dos secuencias. En realizaciones preferidas de la presente invención, las secuencias nucleotídicas y peptídicas aquí descritas comprenden al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%,
15 al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 88% de identidad, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%,
20 al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o un 100% de identidad sobre una secuencia de referencia, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada según se mide usando los algoritmos arriba descritos.

25 En otra realización preferida, las células hospedadoras de la invención según se describen aquí, pueden presentar, adicionalmente, un incremento de al menos un 1% de la expresión y/o secreción de al menos una enzima celulolítica contributiva respecto al porcentaje de la expresión y/o secreción de la(s) misma(s) enzima(s) celulolítica(s) contributiva(s) en una célula hospedadora parental o silvestre.

30

En una realización preferida, las células hospedadoras de la invención, para presentar un incremento en la expresión de al menos una de las enzimas celulolíticas contributivas, pueden sufrir modificaciones genéticas con el objetivo de mejorar la expresión y secreción de al menos una de dichas enzimas, la estabilidad de las mismas u otras propiedades
35 deseables para la inducción del incremento en la expresión y/o secreción de la(s) enzima(s) celulolítica(s) contributiva(s). En realizaciones más particulares, las células hospedadoras,

adicionalmente se modifican genéticamente para incrementar la expresión o insertar más de una copia de las secuencias codificantes de enzimas celulolíticas contributivas que pueden ser tanto homólogas como heterólogas. En una realización preferida, la sobre-expresión de una o más celulasas contributivas se lleva a cabo para aumentar la producción o proporción de las celulasas contributivas. En otras realizaciones más particulares aún, las células hospedadoras de la invención se caracterizan por que además de presentar un incremento en la expresión de al menos una de las enzimas celulolíticas contributivas, dichas enzimas, presentan además una mayor actividad celulolítica. La modificación genética para la obtención de dichas características en las cepas de la invención, puede lograrse por técnicas de ingeniería genética o usando técnicas microbiológicas clásicas tales como mutagénesis química o UV y posterior selección. Puede usarse una combinación de modificación recombinante y técnicas de selección clásicas para producir el organismo de interés. Usando tecnología recombinante, las moléculas de ácidos nucleicos pueden introducirse, sobre-expresarse o modificarse, de un modo que se produce elevado rendimiento de la secreción de las enzimas celulolíticas contributivas dentro del organismo o en el cultivo. En un enfoque de ingeniería genética, la recombinación homóloga puede usarse para inducir modificaciones de genes elegidos como diana, eligiendo específicamente como diana un gen *in vivo* para incrementar la expresión de la proteína codificada.

En algunas realizaciones preferidas, la célula hospedadora descrita en la presente invención ha sido genéticamente modificada para sobre-expresar al menos una de las enzimas celulolíticas contributivas en aproximadamente al menos un 1%, aproximadamente al menos un 5%, aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 20%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 30%, aproximadamente al menos un 35%, aproximadamente al menos un 40%, aproximadamente al menos un 45%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 55%, aproximadamente al menos un 60%, aproximadamente al menos un 65%, aproximadamente al menos un 70%, aproximadamente al menos un 75%, aproximadamente al menos un 80%, aproximadamente al menos un 85%, aproximadamente al menos un 90%, aproximadamente al menos un 95%, aproximadamente al menos un 96%, aproximadamente al menos un 97%, aproximadamente al menos un 98%, aproximadamente al menos un 99%, aproximadamente al menos un 100% respecto a la expresión de dichas enzimas celulolíticas contributivas en una célula hospedadora silvestre.

35

En otra realización preferida, las células hospedadoras de la invención se caracterizan por que presentan sobre-expresión de al menos una de las enzimas celulolíticas contributivas seleccionadas mediante el método descrito en la presente invención.

5 En otra realización más preferida, las células hospedadoras de la invención se caracterizan por que las celulasas contributivas pueden derivar de la célula hospedadora de la invención (homólogas) o de otros microorganismos productores de enzimas celulolíticas diferentes de la célula hospedadora de la invención (heterólogas). Igualmente, se pueden producir de forma natural o recombinante.

10

En otra realización más preferida, las células hospedadoras de la invención se caracterizan por que la enzima celulolítica contributiva que puede incrementar su expresión es preferentemente una celobiohidrolasa. En una realización más preferida, dicha celobiohidrolasa es preferentemente cualquier celobiohidrolasa que presente la mayor

15 eficiencia dentro su familia.

En otra realización más preferida, las células hospedadoras de la invención se caracterizan por que la enzima celulolítica contributiva que puede incrementar su expresión es preferentemente una endoglucanasa. En una realización más preferida aún, la

20 endoglucanasa es preferentemente cualquier endoglucanasa que presente la mayor eficiencia dentro de su propia familia. En otra realización más preferida, la endoglucanasa preferida es la endoglucanasa 2. En otra realización más preferida, la endoglucanasa 2 comprende preferentemente una secuencia que tiene al menos 60% de identidad con la SEQ ID NO: 6, y opcionalmente codificada por una secuencia nucleotídica que comprende

25 una secuencia que tiene al menos 60% de identidad con la SEQ ID NO: 5. De forma más preferida aún, la endoglucanasa 2 es la endoglucanasa 2 que comprende la SEQ ID NO: 6, opcionalmente codificada por la secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 5.

En otra realización más preferida, las células hospedadoras de la invención se caracterizan

30 por que la enzima celulolítica contributiva que puede incrementar su expresión es preferentemente una beta-glucosidasa. En una realización más preferida aún, la beta-glucosidasa es preferentemente cualquier beta-glucosidasa que presente la mayor eficiencia dentro de su propia familia.

35 En otra realización más preferida, las células hospedadoras de la invención se caracterizan por que la enzima celulolítica contributiva que puede incrementar su expresión es

preferentemente una endoxilanasas. En una realizaci3n m3s preferida a3n, la endoxilanasas es preferentemente cualquier endoxilanasas que presente la mayor eficiencia dentro de su propia familia.

5 En otra realizaci3n m3s preferida, las c3lulas hospedadoras de la invenci3n se caracterizan por que la enzima celulol3tica contributiva que puede incrementar su expresi3n es preferentemente una beta-xilosidasas. En una realizaci3n m3s preferida a3n, la beta-xilosidasas es preferentemente cualquier beta-xilosidasas que presente la mayor eficiencia dentro de su propia familia.

10

En otra realizaci3n m3s preferida, las c3lulas hospedadoras de la invenci3n se caracterizan por que la enzima celulol3tica contributiva que puede incrementar su expresi3n es preferentemente una polisac3rido mono-oxigenasas. En una realizaci3n m3s preferida a3n, la polisac3rido mono-oxigenasas es preferentemente cualquier polisac3rido mono-oxigenasas que presente la mayor eficiencia dentro de su propia familia.

15

En una realizaci3n m3s preferida a3n, la c3lula hospedadora de la invenci3n se caracteriza por que presenta una expresi3n reducida de una endoglucanasas no contributiva hom3loga que tiene al menos un 60% de identidad con la endoglucanasas 6 que comprende la SEQ ID NO: 2, opcionalmente codificada por una secuencia nucleot3dica que tiene al menos un 60% de identidad con la endoglucanasas 6 que comprende la SEQ ID NO: 1. De forma m3s preferida a3n, la endoglucanasas 6 es la endoglucanasas 6 que comprende la SEQ ID NO: 2, opcionalmente codificada por la secuencia nucleot3dica que comprende la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la expresi3n reducida se refiere a la delec3n del gen que codifica para la endoglucanasas 6.

20

25

En una realizaci3n m3s preferida a3n, la c3lula hospedadora de la invenci3n se caracteriza por que presenta una expresi3n reducida de una polisac3rido mono-oxigenasas no contributiva hom3loga que tiene al menos un 60% de identidad con la polisac3rido mono-oxigenasas 09768 que comprende la SEQ ID NO: 4, opcionalmente codificada por una secuencia nucleot3dica que tiene al menos un 60% de identidad con la polisac3rido mono-oxigenasas 09768 que comprende la SEQ ID NO: 3. De forma m3s preferida a3n, la polisac3rido mono-oxigenasas 09768 es la polisac3rido mono-oxigenasas 09768 que comprende la SEQ ID NO: 4, opcionalmente codificada por la secuencia nucleot3dica que comprende la SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, la expresi3n reducida se refiere a la delec3n del gen que codifica para la polisac3rido mono-oxigenasas 09768.

30

35

En otra realización preferida, la célula hospedadora de la invención se caracteriza por que presenta una expresión reducida de una endoglucanasa no contributiva homóloga que tiene al menos un 60% de identidad con la endoglucanasa 6 que comprende la SEQ ID NO: 2, opcionalmente codificada por una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 60% de
 5 identidad con la endoglucanasa 6 que comprende la SEQ ID NO: 1 y una expresión reducida de una polisacárido mono-oxigenasa no contributiva homóloga que tiene al menos un 60% de identidad con la polisacárido mono-oxigenasa 09768 que comprende la SEQ ID NO: 4, opcionalmente codificada por una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 60% de
 10 identidad con la polisacárido mono-oxigenasa 09768 que comprende la SEQ ID NO: 3.

En otra realización más preferida aún, la célula hospedadora de la invención se caracteriza por que presenta una expresión reducida de la endoglucanasa 6 de SEQ ID NO: 2 y de la la polisacárido mono-oxigenasa 09768 de SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, la expresión reducida de la endoglucanasa 2 y de la polisacárido mono-oxigenasa 09768 se refiere a la
 15 delección de los genes que codifican para dichas enzimas.

Tal y como se describe en el presente documento, la "célula hospedadora", incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similares con una o varias construcciones de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un
 20 polinucleótido que codifica para las celulasas descritas aquí, tanto celulasas contributivas como celulasas no contributivas. La célula huésped puede ser una célula eucariota o una célula procariota.

En una realización particular la célula huésped es una célula procariota que se selecciona preferiblemente del grupo de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Esherichia*,
 25 *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Thermoanaerobacterium* o *Zymomonas*.

En otra realización particular, la célula huésped es una célula eucariota que se selecciona preferentemente del grupo de hongos de los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*,
 30 *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humícola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*,
 35 *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*,

Scytalidium, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella o Xylaria.

5 En una realización aún más preferida, la célula hospedadora de la invención es cualquier cepa de la especie *Myceliophthora thermophila*. En una realización aún más preferida, la célula hospedadora de la invención es la cepa C1 de *Myceliophthora thermophila*.

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

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un cóctel enzimático obtenido por las células hospedadoras de la invención. Dicho cóctel enzimático comprende, al menos, las enzimas celulolíticas contributivas según se han definido anteriormente y que son secretadas por las células hospedadoras de la invención, por lo que carecerá de al menos una de las enzimas celulolíticas no contributivas según se han definido anteriormente. A partir de aquí y a lo largo del presente documento, a este cóctel se le denominará “cóctel de la invención”. Preferiblemente, en una realización particular, el cóctel enzimático al que se refiere la presente invención comprende las enzimas celulolíticas contributivas según se han definido anteriormente y carece de la actividad enzimática de, al menos, una celulasa con actividad endoglucanasa, preferentemente, la endoglucanasa 6 (Eg6), y/o de al menos una celulasa con actividad polisacárido monooxigenasa, preferiblemente la PMO-09768.

25 El cóctel de la invención puede suplementarse además adicionando otras enzimas accesorias o adicionales, que pueden ser tanto homólogas como heterólogas, y que además se caracterizan por que su actividad enzimática específica no puede reemplazarse por ninguna de las actividades enzimáticas que presentan las enzimas celulolíticas contributivas.

30 Dichas enzimas accesorias o adicionales se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes: aminopeptidasas, amilasas, carbohidrasas, carboxipeptidasas, catalasas; quitinasas, cutinasas, ciclodextrina glucosiltransferasas, desoxirribonucleasas, esterases, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasas, haloperoxidasas, invertasas, lacasas, lipasas, manosidasas, oxidasas, oxidoreductasas, enzimas pectinolíticas, peptidoglutaminasas, peroxidasas, proteasas, fitasas, polifenoloxidasas,

35

enzimas proteolíticas, ribonucleasas, transglutaminasas, o cualquiera de sus combinaciones, siempre que no presente las enzimas celulolíticas no contributivas.

Esta(s) enzima(s) accesorias(s) o adicional(es) puede(n) proceder, tanto de la propia célula hospedadora como de otros microorganismos capaces de secretar enzimas celulolíticas que presenten las actividades arriba indicadas, por ejemplo, mediante un microorganismo que pertenece al género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, tal como *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*; *Gibberella*, tal como *Gibberella zeae*; *Humicola*, tal como *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; *Trichoderma*, tal como *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*; o *Myceliophthora*, tal como *Myceliophthora thermophila*.

Por tanto, en una realización más preferida, el cóctel de la invención comprende además otras enzimas celulolíticas accesorias o adicionales según se describe en los párrafos anteriores, que se pueden producir de forma natural o recombinante.

En una realización más preferida, el cóctel de la invención es una mezcla enzimática obtenida de la célula hospedadora de la invención. En una realización aún más preferida, el cóctel de la invención es una mezcla enzimática obtenida mediante la célula hospedadora de la invención, preferiblemente *M. thermophila*, que presenta una menor expresión y/o secreción de enzimas celulolíticas no contributivas homólogas en relación a una célula hospedadora, preferiblemente *M. thermophila* parental o silvestre, que presenta una expresión y/o secreción normal de todas las enzimas celulolíticas.

El cóctel de la invención se puede preparar de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica y puede estar en forma líquida o tratarse de una composición seca. Las enzimas que se van a incluir en el cóctel pueden estabilizarse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica.

35

Tal como se ha indicado anteriormente, la célula hospedadora de la invención es capaz de secretar las enzimas contributivas al medio junto con otras enzimas celulolíticas adicionales producidas de forma natural o recombinante, siendo de esta manera útil para la optimización de la etapa de hidrólisis de la biomasa en azúcares fermentables.

5

Por tanto, otro aspecto descrito en la invención se refiere al uso de la célula hospedadora de la invención o del cóctel de la invención, para la degradación de la biomasa.

La célula hospedadora o el cóctel de la presente invención, se pueden utilizar para producir, a partir de biomasa, preferentemente biomasa vegetal, monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como materias primas químicas o de la fermentación para la producción de etanol, plásticos, u otros productos o intermedios.

10

La célula hospedadora de la presente invención se puede utilizar como una fuente de polipéptidos que tienen actividad celulasa, utilizándose dichos polipéptidos en procesos de degradación o hidrólisis y fermentación de la biomasa.

15

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

20

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

25

El término “bioproducto” o “productos biobasados” se refiere a los productos de alto valor añadido que pueden obtenerse por transformación química de los azúcares o por fermentación de dichos azúcares con diferentes microorganismos. Sin pretender ser limitativa, una lista de posibles microorganismos fermentativos es la siguiente: *Bacillus thermoglucosidaisus*, *Clostridium butyricum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus sp.*, *Leunoscoc mesenteroides*, *Thermoanaerobacter BG1L1*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*, *Zymobacter palmae*, *Zymomonas mobilis* *Candida*

35

arabinofermentans, Candida boidinii, Candida diddensis, Candida fermentans, Chrysosporium lucknowense, Candida pastoris, Candida shehatae, Candida sonorensis, Candida tropicalis, Hansenula anómala, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces marxianus, Pichia pastoris, Pichia stipitis, Saccharomyces cerevisiae,

5 *Saccharomyces bulderi, Saccharomyces barnetti, Saccharomyces exiguus, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces uvarum o Schizosaccharomyces pombe* o mezclas de estos. Estos y otros microorganismos pueden proporcionar por fermentación de diferentes azúcares, bioproductos entre los cuales se pueden citar de manera no limitativa los siguientes: alcoholes como etanol, metanol, butanol, hexanol, octanol, decanol, dodecanol,

10 1,3-butanediol(1,3-diol), 1-alcohol; ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido acético, ácido itaconico, ácido láctico, ácido glutámico, ácido succínico, beta-cetoácido, beta-cetoalcohol, beta-hidroxiácido; cetonas como la acetona; gases como hidrógeno o dióxido de carbono; hidrocarburos como alcanos alquenos o alquinos; sustancias nitrogenadas como aminas, amida, nitrocompuestos o nitrilos; haluros; aminoácidos como ácido glutámico; antibióticos

15 como penicilina o tetraciclinas; vitamina como riboflavina, vitamina B12 o betacaroteno; ácidos grasos como ácido dodecanoico, ácidos grasos trans- $\Delta 2$ o ácido palmítico; y otros productos como etileno, glicerol, 1,3-propano-diol, betalactano, cefalosporinas, ácidos grasos trans o furano.

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

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

30 es bioetanol.

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

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir azúcares fermentables, denominado aquí “primer procedimiento de la invención” que comprende:

- 5 a) Incubar biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, con la célula hospedadora de la invención, o con el cóctel de la invención, y
- b) Recuperar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la etapa (a).

Frecuentemente se requiere un procedimiento de pretratamiento de la biomasa para
10 aumentar el acceso de las enzimas a sus sustratos y la hidrólisis eficaz consiguiente. El pretratamiento utiliza diversas técnicas, que incluyen, pero no se limitan a tratamientos químicos y/o mecánicos, como por ejemplo la explosión de la fibra con amonio, tratamiento con ácido diluido y explosión con vapor a elevadas temperaturas para alterar la estructura de la biomasa celulósica y volver la celulosa más accesible. El uso de la célula hospedadora
15 de la invención o del cóctel de la invención en los procedimientos de la presente invención es ventajoso debido a que no se requieren altas temperaturas en el proceso de pretratamiento de la biomasa.

El término “azúcar fermentable” tal como se usa aquí, se refiere a azúcares sencillos, tales
20 como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, ramnosa, sacarosa o fructosa, entre otros.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un bioproducto a partir de biomasa, denominado a partir de ahora “segundo procedimiento de la invención”, que comprende:

- a) Incubar biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, con la célula hospedadora de la invención o con el cóctel de la invención,
- b) Fermentar los azúcares fermentables obtenidos después de la etapa de incubación (a) con al menos un microorganismo fermentador, y
- 30 c) Recuperar el bioproducto obtenido después de la fermentación de la etapa (b).

Antes (es decir en la etapa (a)) y/o simultáneamente con la fermentación de la etapa (b), la biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, se hidroliza para degradar la celulosa y la hemicelulosa en azúcares y/o oligosacáridos. El contenido en sólidos durante la hidrólisis
35 puede estar, pero sin limitación, comprendido entre el 5-40% del peso total, preferiblemente entre el 10-40% del peso total, más preferiblemente entre el 15-25% del peso total. La

hidrólisis se realiza como un proceso en el que la biomasa, preferiblemente biomasa pretratada, se incuba con la célula hospedadora de la invención o con el cóctel de la invención que contiene enzimas celulolíticas y forman así la solución de hidrólisis. El tiempo de proceso adecuado, la temperatura y las condiciones de pH pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Preferiblemente, dicha hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25 °C y 60 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, específicamente alrededor de 50 °C. El proceso se realiza preferiblemente a un pH en el intervalo de 3-8, preferiblemente pH 4-6, especialmente alrededor de pH 5. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza en un tiempo comprendido entre 12 y 144 horas, preferiblemente entre 16 y 120 horas, más preferiblemente entre 24 y 96 horas, incluso más preferiblemente entre 32 y 72 horas.

La hidrólisis (etapa (a)) y la fermentación (etapa (b)) pueden realizarse simultáneamente (proceso SSF) o secuencialmente (proceso SHF). De acuerdo con la invención, la biomasa hidrolizada, y preferiblemente pretratada, se fermenta por al menos un microorganismo fermentador capaz de fermentar azúcares fermentables, tales como glucosa, xilosa, manosa y galactosa directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en un tiempo comprendido entre 8 y 96 horas, preferiblemente entre 12 y 72, más preferiblemente entre 24 y 48 horas. En otra realización preferida, la fermentación se realiza a una temperatura entre 20 °C y 40 °C, preferiblemente de 26 °C a 34 °C, en particular alrededor de 32 °C. En otra realización preferida, el pH es de 3 a 6 unidades, preferiblemente de 4 a 5. Se prefiere para la fermentación etanólica una levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, tanto silvestre como modificada genéticamente. Son preferidas las cepas que sean resistentes a altos niveles de etanol, hasta, por ejemplo, el 5 o el 7% en vol. de etanol o más, tal como el 100% en vol. de etanol.

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

El término “recuperación” tal como se usa aquí, se refiere a la recogida de azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la etapa (a) del primer procedimiento de la invención o del bioproducto obtenido después de la fermentación de la etapa (b) del

segundo procedimiento de la invención. Se puede realizar la recuperación mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo los mecánicos o los manuales.

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Figura 1. (A). Representación de la composición y concentración (expresado en forma de porcentaje relativo) de enzimas celulasas incluidas en un cóctel enzimático que podría ser obtenido de una célula hospedadora parental no modificada genéticamente. **(B).** Representación de la composición y concentración (expresado en forma de porcentaje
20 relativo) de enzimas celulasas incluidas en un cóctel enzimático que podría ser obtenido de una célula hospedadora modificada según se describe en la presente invención. Como se observa en la Figura 1B, dicho cóctel enzimático muestra una menor diversidad enzimática y una mayor representación de las enzimas contributivas, más eficientes en las condiciones industriales en las que se emplearán, en detrimento de la diversidad de las
25 mismas.

Figura 2. (A) Esquema del vector pBASE7. Plásmido base que permite clonar los extremos flanqueantes del gen que se pretende delecionar. Incluye como marcador de selección el gen *amdS* que confiere resistencia a acetamida. El marcador de selección incluye su región
30 promotora (P_{amdS}) y terminadora (T_{amdS}). A ambos lados del gen *amdS* se encuentran dos regiones REP (repetidas) que permiten, una vez integrado el vector en el genoma y mediante recombinación homóloga entre ellas, la eliminación del marcador de selección *amdS*. **(B)** Esquema del plásmido pBASE7-eg6 utilizado para delecionar el gen *eg6*. Las regiones aguas arriba (región 5') y aguas abajo (región 3') del gen *eg6* se han clonado en el
35 vector pBASE7. Este plásmido una vez linealizado se utilizará para delecionar el gen *eg6*.

Figura 3. Comprobación genética de la delección del gen *eg6*. Amplificación mediante PCR de un fragmento interno de 350pb del gen *eg6*. Esta amplificación es negativa en el caso de $\Delta eg6$, que es la cepa en la que se ha delecionado el gen *eg6*.

5 **Figura 4.** Análisis de la liberación de glucosa a partir de biomasa molida sometida a una composición enzimática celulolítica obtenida a partir de una cepa de *M. thermophila* que no expresa el gen *eg6* respecto a la cepa parental de *M. thermophila*.

10 **Figura 5.** Fotografía de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%) donde se muestran las celulasas presentes en dos composiciones enzimáticas, una contiene la enzima endoglucanasa 6 (+Eg6), que ha sido obtenida de una cepa control de *M. thermophila* no modificada, y otra que carece de dicha enzima (-Eg6). Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: composición enzimática sin Eg6; Carril 3: composición enzimática con Eg6. La flecha indica la banda de proteína que corresponde a la enzima endoglucanasa 6.
15 6.

Figura 6. Análisis de la liberación de glucosa a partir de biomasa molida sometida a una composición enzimática celulolítica obtenida a partir de una cepa de *M. thermophila* que no expresa el gen de la polisacárido mono-oxigenasa 09768 respecto a la cepa parental de *M. thermophila*.
20 *thermophila*.

Figura 7. Fotografía de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%) donde se muestran las celulasas presentes en dos composiciones enzimáticas, una comprende la enzima polisacárido mono oxigenasa (+PMO 09768), que ha sido obtenida de una cepa control de *M. thermophila* no modificada, y otra que carece de dicha enzima (-PMO 09768). Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: composición enzimática sin PMO 09768; Carril 3: composición enzimática con PMO 09768. La flecha indica la banda de proteína que corresponde a la enzima PMO 09768.
25

30 **Figura 8.** Análisis de la liberación de glucosa a partir de biomasa molida sometida a diferentes composiciones enzimáticas obtenidas de cepas de *M. thermophila* que no expresan el gen que codifica para la endoglucanasa 6 respecto a las respectivas cepas de *M. thermophila* parentales que sí expresan dicho gen.

35

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante ensayos que pone de manifiesto la efectividad de los objetos de la invención.

5

Ejemplo 1. Construcción de un plásmido capaz de delecionar el gen *eg6*. Transformación de la cepa *M. thermophila* con dicho plásmido para la obtención de la cepa $\Delta eg6$.

10 El gen *eg6* (SEQ ID NO: 1) de *M. thermophila* C1 fue el gen candidato a delecionar dado su potencial de mejora en la composición enzimática carente de esta actividad. Para ello, se construyó un plásmido que permite delecionar el gen *eg6* en *M. thermophila* C1. Dicho plásmido contiene fragmentos aguas arriba y aguas abajo del gen *eg6* de tal forma que mediante recombinación homóloga con el genoma de *M. thermophila* C1, se sustituya el gen
15 *eg6* por el marcador de selección clonado entre ambos fragmentos.

El fragmento aguas arriba del gen *eg6* se amplificó a partir de ADN genómico de *M. thermophila* C1 como diana (obtenido usando el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen) con la ADN polimerasa iProof High-Fidelity (BioRad) usando los oligonucleótidos 1 (cebador
20 directo) (ACCGAGCTCGTAGCACTCGCTGTGTATCCTC) (SEQ ID NO: 7) y 2 (cebador inverso) (CCTGGATCCCTTATACCCAGGACATTACAGTTC) (SEQ ID NO: 8). Estos oligos incluyen las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *SacI* y *Bam*HI. De la misma forma se amplificó el fragmento aguas abajo del gen *eg6* con los oligonucleótidos 3 (cebador directo) (ACCGAATTCATCAAATGGATAGGTTCGTAATG)
25 (SEQ ID NO: 9) y 4 (cebador inverso) (CACCTCGAGCAAGGAAGTCGAGTACGAGTCC) (SEQ ID NO: 10). Estos oligonucleótidos incluyen las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *Eco*RI y *Xho*I. Las condiciones de amplificación para ambos fragmentos son un ciclo a 95 °C durante 2 minutos y 30 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 55°C durante 20 segundos, 72 °C durante 90 segundos y 72 °C durante 10
30 minutos.

Una vez amplificados los fragmentos aguas arriba y aguas abajo del gen *eg6* de tamaños correspondientes a 2005pb y 2018pb respectivamente, se clonaron en el vector pBASE7 (Figura 2A). Este vector contiene como marcador de selección el gen *amdS* que confiere
35 capacidad de utilizar la acetamida como fuente de nitrógeno. En primer lugar, el fragmento amplificado correspondiente al extremo 3' del gen (situado aguas abajo del mismo) se digirió

con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* y se clonó en el vector pBASE7 digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. La mezcla de ligación se transformó en células electrocompetentes de *Escherichia coli* XL1Blue MRF siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Stratagene). Una vez obtenido este plásmido se continuó
5 clonando el extremo situado aguas arriba del gen *eg6*. Para ello el fragmento correspondiente se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI* y se clonó en el plásmido donde previamente se había clonado el extremo aguas abajo. La mezcla de ligación se transformó en células electrocompetentes de *Escherichia coli* XL1Blue MRF siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Stratagene). El plásmido obtenido
10 (pBASE7-*eg6*) se muestra en la Figura 2B.

El ADN plasmídico para delecionar el gen *eg6* se linealizó mediante digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *BamHI* y se utilizó para transformar células huésped de la cepa *M. thermophila* C1 (Verdoes et al., 2007, Ind. Biotechnol., 3 (1)). Este ADN se introdujo
15 en la cepa huésped usando un método de transformación en protoplastos (US7399627B2). Los transformantes se sembraron en placas de agar conteniendo 0,6 g/L de acetamida (Merck). Tras 5 días de incubación a 35 °C se analizaron los transformantes resultantes (que expresan el gen *amdS* y por tanto son capaces de crecer en presencia de acetamida como única fuente de nitrógeno). Los transformantes obtenidos fueron analizados genéticamente
20 para comprobar si el gen *eg6* había sido sustituido por el marcador de selección. Para ello se obtuvo ADN genómico de los transformantes obtenidos (obtenido usando el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen) con la ADN polimerasa iProof High-Fidelity (BioRad) usando los oligonucleótidos 5 (cebador directo) (GGCTCGAGATCTACAAGACTG) (SEQ ID NO: 11) y 6 (cebador inverso) (GTAGTTGGACACGTTGGTGA) (SEQ ID NO: 12) para amplificar un
25 fragmento interno de *eg6* de 350pb . Las condiciones de amplificación para ambos fragmentos son un ciclo a 95 °C durante 2 minutos y 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 10 minutos.

30 En este ejemplo se identifican aquellas células huésped que han sido transformadas y que no expresan el gen *eg6* (amplificación negativa) frente a aquellas células huésped que expresan dicho gen (amplificación positiva). De esta forma se identificó la cepa *M. thermophila* C1 $\Delta eg6$. La Figura 3 muestra la prueba genética tras la amplificación de un fragmento interno de *eg6* de 350pb. Esta amplificación es negativa en el caso de la cepa
35 $\Delta eg6$.

Ejemplo 2. Evaluación de cepas huésped de *M. thermophila* que carecen de la celulasa no contributiva Eg6 ($\Delta eg6$) frente a las cepas parentales que sí la contienen (+Eg6).

5 Se comparó la liberación de azúcares fermentables de la cepa de *M. thermophila* C1 $\Delta eg6$ con su cepa parental +Eg6. Como sustrato para la hidrólisis enzimática se empleó biomasa pretratada de maíz (“pretreated corn stover”, o PCS). El pretratamiento se realizó mediante un sistema de explosión de vapor (Nguyen et al., 1998, Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72), y su análisis composicional se efectuó de acuerdo los procedimientos descritos por NREL en
 10 “Standard Biomass Analytical Procedures” (http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html). Con objeto de su uso en la hidrólisis, la biomasa fue previamente neutralizada ajustándose a un pH de 5,5. Para el proceso de hidrólisis enzimática se usaron botes ISO de 100 ml con 20 g de la mezcla de reacción al 20% (p/p) de sólidos totales y suplementada con 12 mg proteína por g de
 15 glucano del cóctel procedente de las cepas $\Delta eg6$ y +Eg6, respectivamente. Los frascos con la mezcla se incubaron durante 72 h a 50 °C con una agitación de 150 rpm en un incubador orbital de 25 mm de diámetro (Infors HT). Una vez realizado el proceso, el contenido de glucosa en las muestras resultantes del hidrolizado (*slurry*) se analizó mediante HPLC (Agilent Technologies, 1200 Series) usando un detector del índice de refracción (DIR) y una
 20 columna Aminex HPX-87 H).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4, donde se puede apreciar que la delección de la endoglucanasa no contributiva Eg6 provoca un incremento en la capacidad de sacarificación, es decir, producción de glucosa, con respecto al control que sí expresa la
 25 endoglucanasa Eg6.

En la Figura 5 se muestra la electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las composiciones enzimáticas con y sin Eg6.

30 **Ejemplo 3. Evaluación de cepas *M. thermophila* que carecen de la enzima no contributiva PMO-09768 ($\Delta PMO-09768$) frente a las cepas parentales que sí la contienen.**

De la misma forma que se ha descrito la obtención de una cepa delecionada para el gen *eg6*
 35 (ver Ejemplo 1), se obtuvo una cepa que presentaba la delección del gen PMO-09768 y a la que se le denominó $\Delta PMO-09768$. Se comparó la liberación de azúcares fermentables de la

cepa de *M. thermophila* C1 Δ PMO-09768 con su cepa parental. Como sustrato para la hidrólisis enzimática se empleó biomasa pretratada de maíz (“pretreated corn stover”, o PCS). El pretratamiento se realizó mediante un sistema de explosión de vapor (Nguyen et al., 1998, Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72), y su análisis composicional se efectuó de acuerdo los procedimientos descritos por NREL en “Standard Biomass Analytical Procedures” (http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html). Con objeto de su uso en la hidrólisis, la biomasa fue previamente neutralizada ajustándose a un pH de 5,5. Para el proceso de hidrólisis enzimática se usaron botes ISO de 100 ml con 20 g de la mezcla de reacción al 20% (p/p) de sólidos totales y suplementada con 12 mg proteína por g de glucano del cóctel procedente de las cepas en cuestión. Los frascos con la mezcla se incubaron durante 72 h a 50 °C con una agitación de 150 rpm en un incubador orbital de 25 mm de diámetro (Infors HT). Una vez realizado el proceso, el contenido de glucosa en las muestras resultantes del hidrolizado (*slurry*) se analizó mediante HPLC (Agilent Technologies, 1200 Series) usando un detector del índice de refracción (DIR) y una columna Aminex HPX-87 H).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6, donde se puede apreciar que la deleción de la PMO no contributiva 09768 provoca un incremento en la capacidad de sacarificación con respecto al control, esto es, en la producción de glucosa por la mezcla de las celulasas. En la Figura 7 se muestra la electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las composiciones enzimáticas con y sin PMO-09768.

Ejemplo 4. Evaluación del efecto de la deleción del gen *eg6* (endoglucanasa no contributiva) en diferentes cepas de *M. thermophila*.

Se delecionó el gen que codifica para la endoglucanasa no contributiva Eg6 (SEQ ID NO: 1) en varias cepas de *M. thermophila* con el objeto de demostrar el efecto positivo que tiene dicha deleción sobre la composición enzimática producida por dichas cepas. Para la construcción de las cepas se empleó un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1.

Se obtuvieron dos cepas diferentes que presentaban una deleción en el gen de la *eg6* respecto a las cepas parentales según se describe en el Ejemplo 1.

Como se muestra la Figura 8, la composición enzimática producida por ambas cepas de *M. thermophila* que carecen de la endoglucanasa no contributiva Eg6, es capaz de liberar

mayor concentración de glucosa que las composiciones enzimáticas secretadas por las cepas parentales que contienen la enzima Eg6.

REIVINDICACIONES

1. Célula hospedadora modificada que presenta una expresión y/o secreción reducida de un 100% en una enzima celulolítica que comprende la SEQ ID NO: 2 respecto al porcentaje de expresión y/o secreción de la misma enzima celulolítica en una célula hospedadora parental o silvestre.
2. Célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 1 donde la célula hospedadora es *Myceliophthora thermophila*.
3. Cóctel enzimático obtenido a partir de la célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. El cóctel enzimático de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende además otras enzimas celulolíticas accesorias seleccionadas de entre cualquiera de las siguientes: aminopeptidasas, amilasas, carbohidrasas, carboxipeptidasas, catalasas; quitinasas, cutinasas, ciclodextrina glucosiltransferasas, desoxirribonucleasas, esterases, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasas, haloperoxidasas, invertasas, lacasas, lipasas, manosidasas, oxidasas, oxidoreductasas, enzimas pectinolíticas, peptidoglutaminasas, peroxidasas, proteasas, fitasas, polifenoloxidasas, enzimas proteolíticas, ribonucleasas, transglutaminasas, o cualquiera de sus combinaciones siempre que dicho cóctel no presente las enzimas celulolíticas no contributivas.
5. Uso de la célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o del cóctel enzimático de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, para la degradación de la biomasa.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, para la degradación de la biomasa en un proceso de producción de un bioproducto.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el bioproducto es biocombustible.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el biocombustible es bioetanol.
9. Un procedimiento para producir azúcares fermentables que comprende:

- a. Incubar biomasa con la célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o con el cóctel enzimático de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, y
 - 5 b. Recuperar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación en la etapa (a).
10. Un procedimiento para producir un bioproducto a partir de biomasa que comprende:
- 10 a. Incubar biomasa con la célula huésped de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o con el cóctel enzimático de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4,
 - b. Fermentar los azúcares fermentables obtenidos después de la incubación de la etapa (a) con al menos un microorganismo fermentador, y
 - 15 c. Recuperar el bioproducto obtenido después de la fermentación en la etapa (b).
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, donde el bioproducto es biocombustible.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, donde el biocombustible es
- 20 bioetanol.

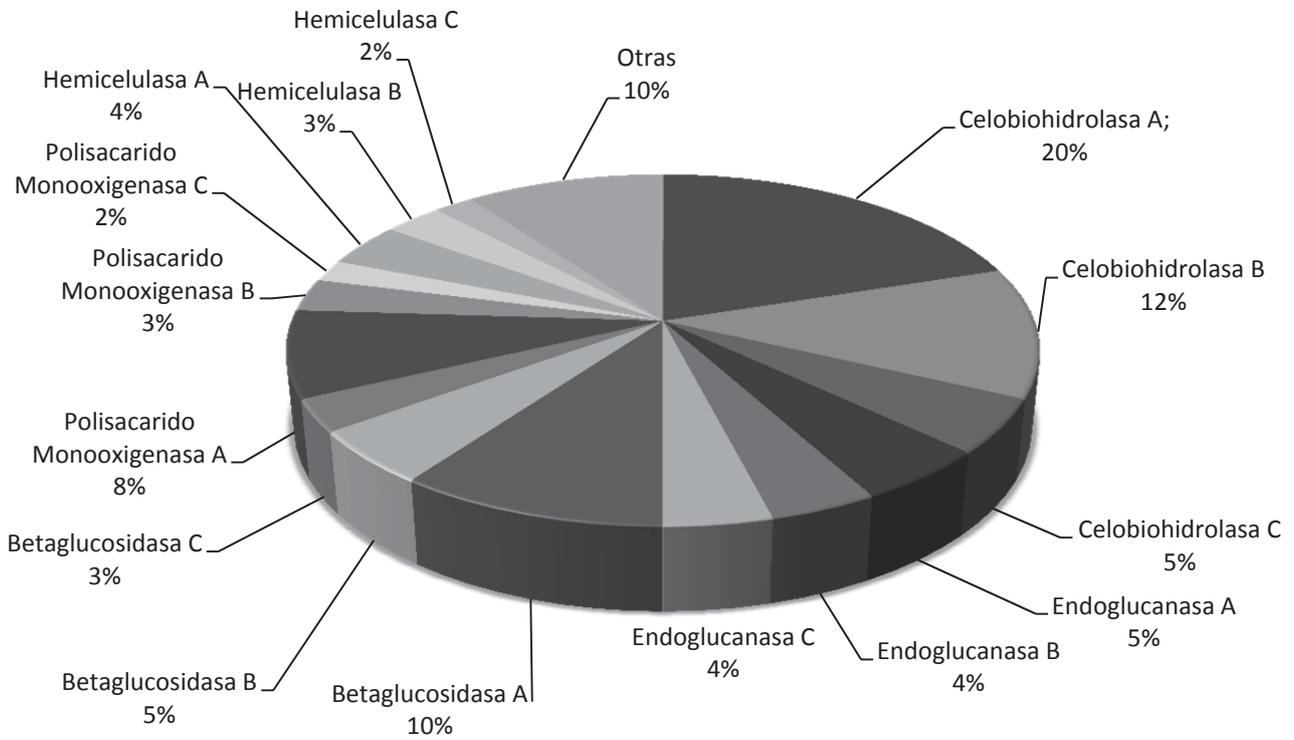


FIG. 1A

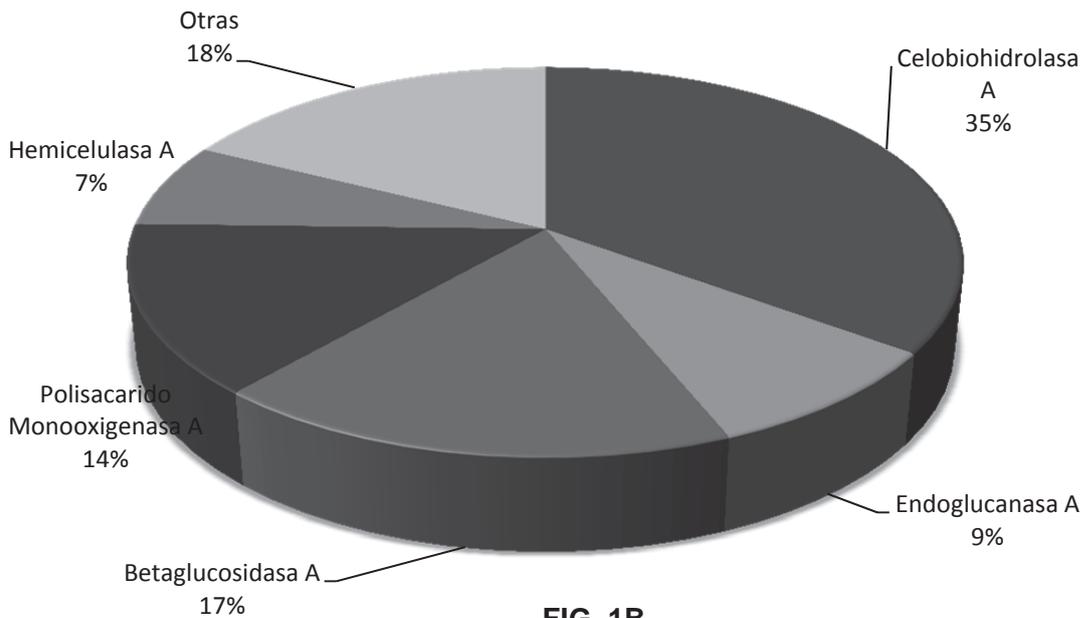


FIG. 1B

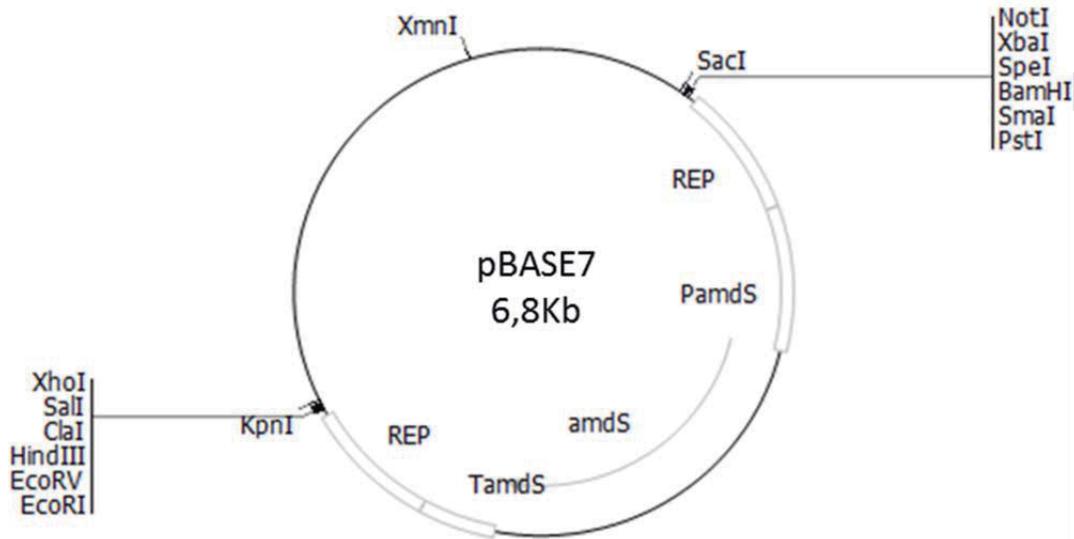


FIG. 2A

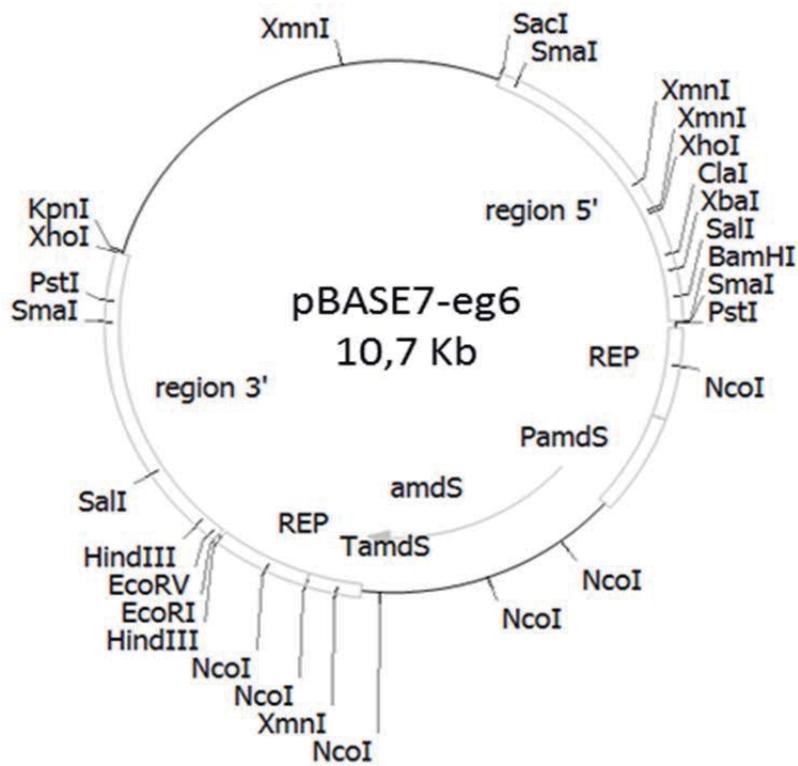


FIG. 2B



FIG. 3

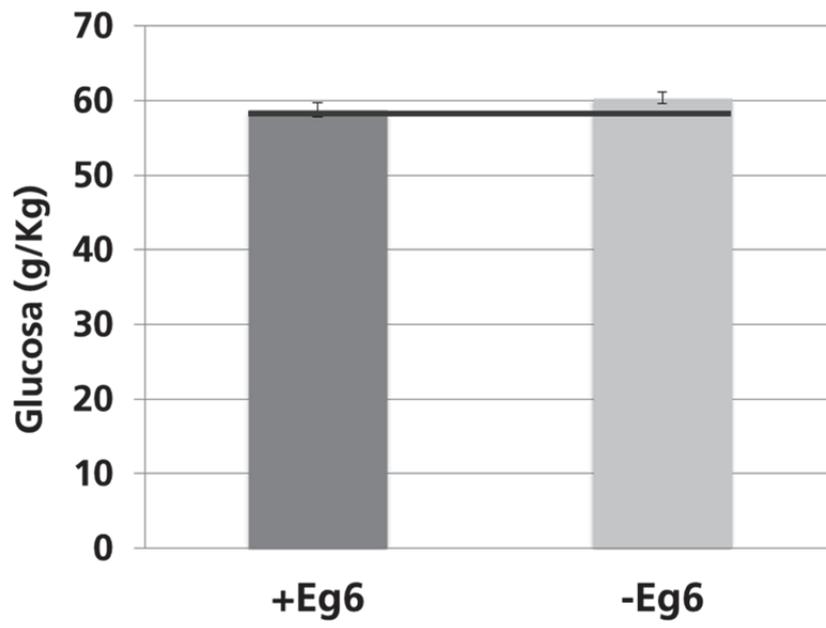


FIG. 4

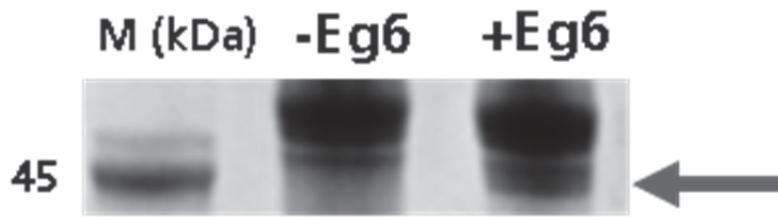


FIG. 5

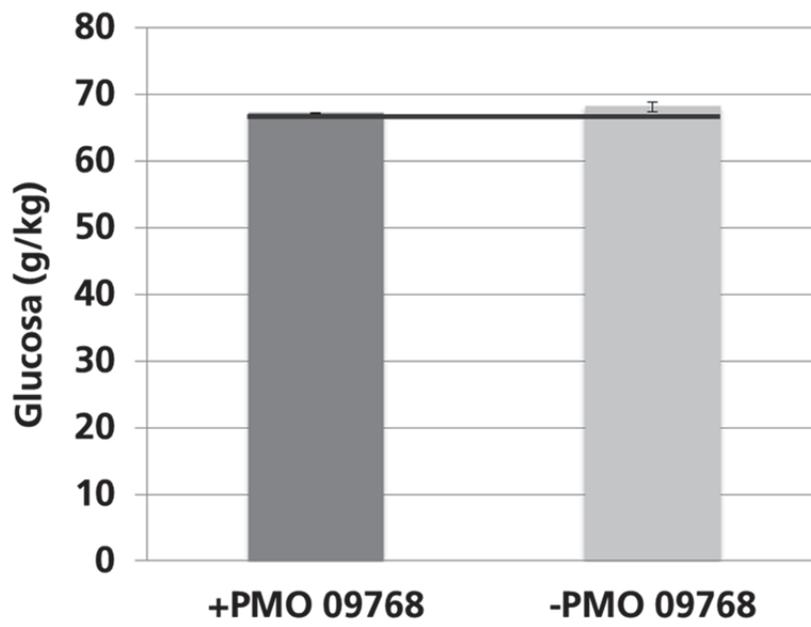


FIG. 6

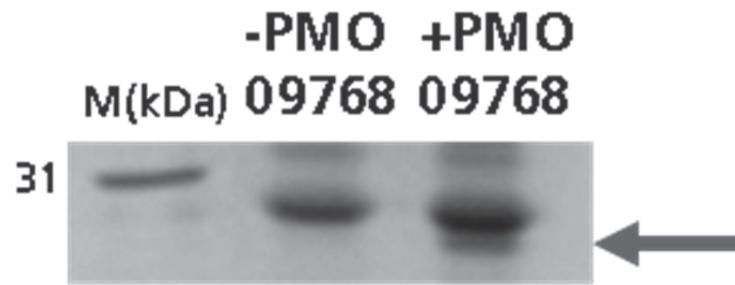


FIG. 7

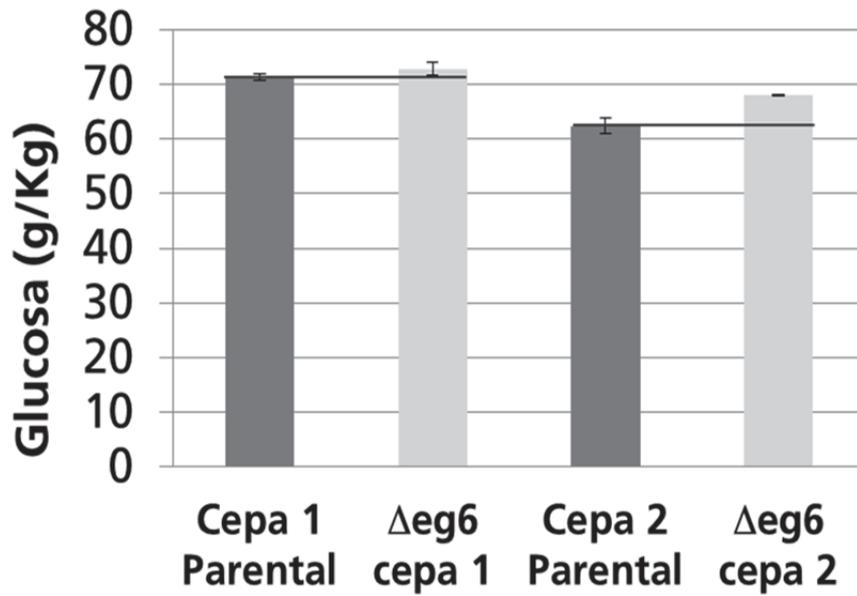


FIG. 8

ES 2 647 322 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías, S.A.
 <120> célula hospedadora con actividad celulolítica mejorada y composiciones enzimáticas obtenidas por la misma
 <130> ES1861.52
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1223
 <212> DNA
 <213> Myceliophthora thermophila
 <400> 1
 atgCGcgtct ctagtTtggT cgCGgCcctt gctaccggtg gtcttGtcgc cgccacgcct 60
 aagcccaagg ggtcgtcgc ccctggggcc gtggacgcga accctttcaa gggcaagacg 120
 cagttcgtca acccgcatg ggcggccaag ctggaacaga ccaaaaaggc gttcctggcc 180
 agaacgaca ccgtcaatgc cgccaagacg gagaaggTcc agcagaccag ctCGttcgtc 240
 tgggtctcga ggatcgccga gctctccaac atcgacgacg ccatcgCGgc tgcccGcaag 300
 gCGcagaaga agacgggCag gaggcagatc gtcggcctgg tgctctacaa ctttccggac 360
 cgcgactgca gCGcgggCga gagcgcgggc gagctcagca gCGacaagaa cgggctcGag 420
 atctacaaga ctgagttcgt caagcccttC gccgacaagg tggcggccgc aaaggacctc 480
 gacttcgcca tcgtcctgga gcccgactcg ctggccaacc tggtcaccaa cctgggcatc 540
 gagttctgCG ccaacgCCgc ccccgTctac cgCGagggca tcgcctatgc catctccagc 600
 cttcagcagc caaacgtgca cttgtacatc gatgctgccc acggcggctg gctcggctgg 660
 gacgacaacc tgccgctggc cgccaaggag tttgccgagg tggTcaagct tgccggcgag 720
 ggcaagaaga tccgCGgctt cgtcaccaac gtgtccaact acaaccctt ccacgCCgTc 780
 gtgCGcgaga actttaccga gtggagcaac tcgtgggacg agtctcacta cgcctcctcg 840
 ctcacaccgt tcctcgagaa agaggggctg ccggcacgct tcatcgTcga ccagggTcgc 900
 gttGCCctcc cgggagcccG caaggagtgg tgagtttCga ccagattgac cctcgaccca 960
 tgCGaccgag attgctgacg attgaattgc gtgtcccGtc cccaggggT gaatggTgca 1020
 acgtggcacc cgccggattt ggccccgCgc ccacgaccag ggtcaacaac accgTcgtcG 1080
 atgctctcgt ctgggtcaag cctggCGgCG agagcGacgg cGagTgtggc ttggctggCG 1140
 ccccaaggc cggccagtgg ttcgacgagT acgcccagat gctggTcGag aatgcccacc 1200
 cgtctgtcgt ccacaagtgg tag 1223

<210> 2
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila
 <400> 2

ES 2 647 322 A1

Met Arg Val Ser Ser Leu Val Ala Ala Leu Ala Thr Gly Gly Leu Val
1 5 10 15

Ala Ala Thr Pro Lys Pro Lys Gly Ser Ser Pro Pro Gly Ala Val Asp
20 25 30

Ala Asn Pro Phe Lys Gly Lys Thr Gln Phe Val Asn Pro Ala Trp Ala
35 40 45

Ala Lys Leu Glu Gln Thr Lys Lys Ala Phe Leu Ala Arg Asn Asp Thr
50 55 60

Val Asn Ala Ala Lys Thr Glu Lys Val Gln Gln Thr Ser Ser Phe Val
65 70 75 80

Trp Val Ser Arg Ile Ala Glu Leu Ser Asn Ile Asp Asp Ala Ile Ala
85 90 95

Ala Ala Arg Lys Ala Gln Lys Lys Thr Gly Arg Arg Gln Ile Val Gly
100 105 110

Leu Val Leu Tyr Asn Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ser Ala Gly Glu Ser
115 120 125

Ala Gly Glu Leu Ser Ser Asp Lys Asn Gly Leu Glu Ile Tyr Lys Thr
130 135 140

Glu Phe Val Lys Pro Phe Ala Asp Lys Val Ala Ala Ala Lys Asp Leu
145 150 155 160

Asp Phe Ala Ile Val Leu Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr
165 170 175

Asn Leu Gly Ile Glu Phe Cys Ala Asn Ala Ala Pro Val Tyr Arg Glu
180 185 190

Gly Ile Ala Tyr Ala Ile Ser Ser Leu Gln Gln Pro Asn Val His Leu
195 200 205

Tyr Ile Asp Ala Ala His Gly Gly Trp Leu Gly Trp Asp Asp Asn Leu
210 215 220

Pro Leu Ala Ala Lys Glu Phe Ala Glu Val Val Lys Leu Ala Gly Glu
225 230 235 240

Gly Lys Lys Ile Arg Gly Phe Val Thr Asn Val Ser Asn Tyr Asn Pro
245 250 255

Phe His Ala Val Val Arg Glu Asn Phe Thr Glu Trp Ser Asn Ser Trp
260 265 270

ES 2 647 322 A1

Asp Glu Ser His Tyr Ala Ser Ser Leu Thr Pro Phe Leu Glu Lys Glu
 275 280 285

Gly Leu Pro Ala Arg Phe Ile Val Asp Gln Gly Arg Val Ala Leu Pro
 290 295 300

Gly Ala Arg Lys Glu Trp Gly Glu Trp Cys Asn Val Ala Pro Ala Gly
 305 310 315 320

Phe Gly Pro Ala Pro Thr Thr Arg Val Asn Asn Thr Val Val Asp Ala
 325 330 335

Leu Val Trp Val Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly Glu Cys Gly Leu
 340 345 350

Ala Gly Ala Pro Lys Ala Gly Gln Trp Phe Asp Glu Tyr Ala Gln Met
 355 360 365

Leu Val Glu Asn Ala His Pro Ser Val Val His Lys Trp
 370 375 380

<210> 3
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> Myceliophthora thermophila

<400> 3
 atgctgacaa caaccttcgc cctcctgacg gccgctctcg gcgtcagcgc ccattataacc 60
 ctccccaggg tcgggaccgg ttccgactgg cagcacgtgc ggcgggctga caactggcaa 120
 aacaacggct tcgtcggcga cgtcaactcg gagcagatca ggtgcttcca ggcgaccct 180
 gccggcgccc aagacgtcta cactgttcag gcgggatcga ccgtgacctt ccacgccaac 240
 cccagtatct accaccccgg ccccatgcag ttctacctgg cccgcgttcc ggacggacag 300
 gacgtcaagt cgtggaccgg cgagggtgcc gtgtggttca aggtgtacga ggagcagcct 360
 caatttggcg cccagctgac ctggcctagc aacggtgcgt tgatcatttt ccttcttctt 420
 ccttcttctt tccgttgcat atgctaactg ttctcttgct tgcaggcaag agctcgttcg 480
 aggttcctat cccagctgc attcgggcgg gcaactacct cctccgcgct gagcacatcg 540
 ccctgcacgt tgcccaaagc cagggcggcg cccagttcta catctcgtgc gccagctcc 600
 aggtcactgg tggcggcagc accgagcctt ctcagaaggt ttccttcccg ggtgcctaca 660
 agtccaccga ccccgccatt cttatcaaca tcaactacct cgtcctacc tcgtaccaga 720
 atccgggtcc ggctgtcttc cgttgctaa 749

<210> 4
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila

<400> 4

ES 2 647 322 A1

Met Leu Thr Thr Thr Phe Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Gly Val Ser
1 5 10 15

Ala His Tyr Thr Leu Pro Arg Val Gly Thr Gly Ser Asp Trp Gln His
20 25 30

Val Arg Arg Ala Asp Asn Trp Gln Asn Asn Gly Phe Val Gly Asp Val
35 40 45

Asn Ser Glu Gln Ile Arg Cys Phe Gln Ala Thr Pro Ala Gly Ala Gln
50 55 60

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

Pro Ser Ile Tyr His Pro Gly Pro Met Gln Phe Tyr Leu Ala Arg Val
85 90 95

Pro Asp Gly Gln Asp Val Lys Ser Trp Thr Gly Glu Gly Ala Val Trp
100 105 110

Phe Lys Val Tyr Glu Glu Gln Pro Gln Phe Gly Ala Gln Leu Thr Trp
115 120 125

Pro Ser Asn Gly Lys Ser Ser Phe Glu Val Pro Ile Pro Ser Cys Ile
130 135 140

Arg Ala Gly Asn Tyr Leu Leu Arg Ala Glu His Ile Ala Leu His Val
145 150 155 160

Ala Gln Ser Gln Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln Leu
165 170 175

Gln Val Thr Gly Gly Gly Ser Thr Glu Pro Ser Gln Lys Val Ser Phe
180 185 190

Pro Gly Ala Tyr Lys Ser Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Asn
195 200 205

Tyr Pro Val Pro Thr Ser Tyr Gln Asn Pro Gly Pro Ala Val Phe Arg
210 215 220

Cys
225

<210> 5
<211> 3310
<212> DNA
<213> Myceliophthora thermophila

<220>

ES 2 647 322 A1

<221> promoter
<222> (1)..(740)

<220>
<221> terminator
<222> (2359)..(3310)

<400> 5
 aggttttgtg cggtatggag ctaataatat tgaacggatc tctgggccgt cctaaatcgt 60
 tgaaacgcta ggcccagaag gacctgctcg acttggcgaa cggagatttc caggacgaaa 120
 gtcggaacat ctccatccgc ggccaacctg aacacttttg ttcgtttccg gaccatcgac 180
 ccacgaaaac agtgcggttg ctggcacagt cagtactcac aatggcgatg gtccagcccg 240
 ttccgcccg atgcccactt gcagcgcaac tctccttcgt tcggcgccc gccggtgtct 300
 ggcctattag tacgattttg gataccggct tggtcgccgc cgcggttttt cttggccgat 360
 acgggaatct cggtggtccc aactccacct gggcacgctc tggtgccaac atggaacttc 420
 gggatgccgc tccgggcaca gtcaagcgtc ttaaaatgcy accttactcc acaagaatcg 480
 aggcgtaacc cggaattagg gacgcctgga cggcgcaacc cctggaccga agggcctcgc 540
 taaccggggt cctggagccg catgcgccgc tgcccgttg cccgctcttg aggtgacact 600
 tcttttcaac gagcgatggc cgggcaggaa aatgatgtat aagaagcgag ccgattccga 660
 cggactcgac ctctctctcg cctcttgccc tgtgtccgcg agctaattac agcagtcctt 720
 ctcgacttga aacgccccaa atgaagtcct ccacctcgc cagcgtcttc gccacgggcy 780
 ccgtggctca aagtgggccg tggcagcaat gtggtggcat cggatggcaa ggatcgaccg 840
 actgtgtgtc gggctaccac tgcgtctacc agaacgattg gtacagccag tgcgtgcctg 900
 gcgccccgct gacaacgctg cagacatcga ccacgtccag gccaccgccc accagcaccg 960
 cccctccgct gtccaccacc tcgcctagca agggcaagct gaagtggctc ggcagcaacg 1020
 agtcgggcy cgagttcggg gagggcaatt accccggcct ctggggcaag cacttcatct 1080
 tcccgtcgac ttcggcgatt caggtacggc caataataat atattattat agcaggcagg 1140
 agggagcagg agaagaaggg aggggcaggt ggcccacaat cggaagaaga ccgggaggca 1200
 ctgaccggtg attcctttgt gtaatagacg ctcatcaatg atggatacaa catcttccgg 1260
 atcgacttct cgatggagcy tctgggtgcc aaccagttga cgtcgtcctt cgaccagggg 1320
 tacctccgca acctgaccga ggtggtcaac ttcgtgacga acgccccgaa gtacgccgctc 1380
 ctggaccgcy acaactacgg ccggtactac ggcaacatca tcacggacac gaacgcgctt 1440
 cggaccttct ggaccaacct ggccaagcag ttcgcctcca actcgtcgt catcttcgac 1500
 accaacaacg agtacaacac gatggaccag accctggtgc tcaacctcaa ccaggcccgc 1560
 atcgacggca tccgggccgc cggcgcgacc tcgcagtaca tcttcgctga gggcaacgcy 1620
 tggagcgggg cctggagctg gaacacgacc aacaccaaca tggccgccct gacggaccg 1680
 cagaacaaga tcgtgtacga gatgcaccag tacctcgact cggacagctc gggcaccac 1740
 gccgagtgcg tcagcagcac catcggcgcc cagcgcgctc tcggagccac ccagtggtc 1800

ES 2 647 322 A1

cgcgccaacg gcaagctcgg cgtcctcggc gagttcgccg gcggcgccaa cgccgtctgc 1860
 cagcaggccg tcaccggcct cctcgaccac ctccaggaca acagcgacgt ctggctgggt 1920
 gccctctggt gggccgcccg tccctggtgg ggcgactaca tgtactcggt cggtaaagttt 1980
 ctcccttggt cttggtttcc cccccaaata agggagtcag gcaacatgcc caagatcggc 2040
 tcggcttcgc ttcaaggcgt tcgttgtaca cactgaagag ttccaactcc caacctgttc 2100
 gtgtcctccg atcagcttca acgggggtga agggggaagg gatttgggag tgagggtggag 2160
 gtcaaaaagga ggggtattat ccccagacct ccacaaacgg ccctgagcca acagcctctg 2220
 gggtcaaaat gggcgccaac catacgggtca ttactcagg acacctgcta acgcgctctt 2280
 ttttttttgt ttccagagcc tccttcgggc accggctatg tcaactacaa ctcgatcttg 2340
 aagaagtact tgccgtaagg ggcgtgcagc aaggctgagc gagcattatt cggggccatc 2400
 tgcttggtgc ggcaggcatc acgtcaacct atcgaattgg acagcggaat gctccgagac 2460
 gccctacact aagtctggtg atgatcccgg acgctgccgc gcccggtac catgatttca 2520
 tgtacatatt ggttctttgc tttcttaccg ggggggctct gcagcgttgc tgagcgattc 2580
 gttccaagt atatacttg tctggaattg aattttgggt gacattgacc caatcaacca 2640
 gctcggcgtg ctacactccc gttaccccc ctcttctccc cctgctcggc ttggctttcc 2700
 tctccggtgt ggagcacggc cacggcggtc tcaatccata caggaagata agatcgatgg 2760
 tttcctatgg tatacactac ttgggaataa actaatccgt acgctaacta atggacggat 2820
 taccctaagg gtcaccggct caccgttggg tataacactt agggatggg agagctgata 2880
 gaaatattgt actgtacaat ccaaagtaca gatagcacac gaagtatggt agttgggtccc 2940
 gccagtcgg gaccaacaat agaacaatac acgcacgagc agccgtccac tacgcagcag 3000
 tgtgcgttcc tgaggacctg caggaagagg gggggggggg ggttgccaag acgcccgggg 3060
 ttcaaagaaa gtcccgggcc gccgatgaga tgagacggac gccggcccaa ggagaggccg 3120
 gtggtcgatc ctgcaaatgc cagcaaaaaa atccatacca taatccagtc aactttcgtc 3180
 aactcctgt gaaacgagct ggagggactg ctggaaaggt tttgcagggt aatcactgta 3240
 tgtggagcat gccgtaccta ccatgcttcg ttagatagag ttccagttga acatacaaag 3300
 ttctgccccg 3310

<210> 6
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila

<400> 6

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

Gln Ser Gly Pro Trp Gln Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Gln Gly Ser
 20 25 30

ES 2 647 322 A1

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

ES 2 647 322 A1

Val Val Gly Ala Thr Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Leu Gly Val
305 310 315 320

Leu Gly Glu Phe Ala Gly Gly Ala Asn Ala Val Cys Gln Gln Ala Val
325 330 335

Thr Gly Leu Leu Asp His Leu Gln Asp Asn Ser Asp Val Trp Leu Gly
340 345 350

Ala Leu Trp Trp Ala Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Met Tyr Ser
355 360 365

Phe Glu Pro Pro Ser Gly Thr Gly Tyr Val Asn Tyr Asn Ser Ile Leu
370 375 380

Lys Lys Tyr Leu Pro
385

<210> 7
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador directo - Oligonucleótido 1

<400> 7
accgagctcg tagcactcgc tgtgtatcct c 31

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador inverso - Oligonucleótido 2

<400> 8
cctggatccc ttataccag gacattcaca gttc 34

<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador directo - Oligonucleótido 3

<400> 9
accgaattca tcaaatgat aggtcggtaa tg 32

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador inverso - Oligonucleótido 4

ES 2 647 322 A1

<400> 10
cacctcgagc aaggaagtcg agtacgagtc c 31

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador directo - Oligonucleótido 5

<400> 11
ggctcgagat ctacaagact g 21

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador inverso - Oligonucleótido 6

<400> 12
gtagttggac acgttggtga 20