

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 092**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)
C12N 9/58 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2015 PCT/CN2015/000826**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16082305**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2015 E 15862373 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3224356**

54 Título: **Métodos para la expresión recombinante del gen de la β -glucosidasa**

30 Prioridad:

27.11.2014 CN 201410699758

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

10.02.2021

73 Titular/es:

**WILMAR (SHANGHAI) BIOTECHNOLOGY
RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER CO.,
LTD. (100.0%)
No 118 Gaodong Road, Pudong New District
Shanghai 200137, CN**

72 Inventor/es:

**ZENG, ANA;
WANG, GANG;
FENG, QI y
XU, JUN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 805 092 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la expresión recombinante del gen de la β -glucosidasa

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a los campos de la biotecnología y la fermentación. En particular, la presente invención se refiere a un método para la expresión recombinante del gen de la β -glucosidasa a partir de *Trichoderma reesei* a través del proceso de ingeniería genética, cepas microbianas utilizadas en el método y usos de las mismas.

10

Antecedentes de la invención

La celulosa es el componente principal de la pared celular vegetal y es una fuente de carbono renovable que tiene la mayor cantidad en la tierra. El uso de celulosa en la producción de etanol combustible y otros productos químicos a través de la bioconversión tiene una importancia práctica extremadamente importante en la resolución de la crisis energética, la escasez de alimentos, la contaminación ambiental y otros desafíos para los seres humanos.

15

La celulasa, que degrada la celulosa, es un sistema compuesto de múltiples enzimas, que comprende endoglucanasa, exocelobiohidrolasa y β -glucosidasa. Estas tres enzimas actúan sinérgicamente para degradar la celulosa en glucosa. Entre otras, la β -glucosidasa (EC 3.2.1.21, abreviada como BGL), podría hidrolizar la celobiosa para liberar glucosa durante el proceso de hidrólisis de la celulosa por la celulasa, que constituye la etapa clave de la hidrólisis completa de la celulosa.

20

En general, hay varios problemas en el proceso de hidrólisis de celulosa de la siguiente manera. En primer lugar, la actividad de la β -glucosidasa se inhibe por el producto de la hidrólisis, es decir, glucosa, mientras que la celobiosa es un inhibidor de las otras enzimas en el sistema de la celulasa, conduciendo a la inhibición de todo el proceso de hidrólisis de la celulosa. En segundo lugar, en cepas productoras de celulasa, el contenido de β -glucosidasa es muy bajo (excepto *Trichoderma niger*). Por ejemplo, entre las celulasas secretadas por *T. reesei*, el contenido de β -glucosidasa es inferior al 1 %, mucho menos que el nivel de aplicación práctica. En tercer lugar, la inhibición térmica produce una pérdida significativa de la actividad β -glucosidasa durante el proceso de reacción. Como resultado, la actividad de la β -glucosidasa es generalmente menor que la de la endoglucanasa y la exoglucanasa en un orden de magnitud o más, convirtiéndose en la enzima limitante de la degradación de la celulosa (Wang Zhenyu, et. al., "The activity of the endocellulase and β -glucosidase produced by high temperature anaerobic organism", Journal of Dalian Institutes of Light Industry, 2005, 24 (2), 110-114).

25

30

35

En la actualidad, las cepas productoras de celulasa más ampliamente utilizadas son principalmente cepas mutantes superiores de *Trichoderma reesei*, que pueden secretar y producir endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, constituyendo todo el sistema enzimático para la hidrólisis de celulosa (Penttila ME et al., "Expression of two *Trichoderma reesei* Endoglucanase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*", Yeast. Vol. 3, 1987(3): 175-185).

40

Debido a la baja producción de β -glucosidasa en cepas *T. reesei* naturales, el proceso de hidrólisis de la celulosa es limitado. Por lo tanto, la mejora de la actividad de la β -glucosidasa en el sistema celulasa es una de las medidas clave para mejorar el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa y la producción de glucosa.

45

Algunos investigadores sometieron el gen de la β -glucosidasa de *T. reesei* a expresión recombinante en levaduras *Pichia*, y descubrieron que la actividad enzimática aumenta junto con la duración del tiempo de inducción, pero el período de fermentación del mismo es de más de 8 días (Patente China CN102220369B; "Recombinant vector of *Trichoderma reesei* beta-glucosidase gene BGL1, recombinant microorganism, and expression of BGL1 in the recombinant microorganism"). Algunos investigadores sobreexpresaron la β -glucosidasa en *T. reesei* por expresión de fusión, y lograron una actividad enzimática varias veces mayor que la de la cepa original, pero el período de fermentación fue de más de 6 días (Patente China CN 101516906B; "Methods for increasing secretion of polypeptides having biological activity"). En general, los métodos existentes están restringidos por la desventaja de los períodos de fermentación demasiado largos.

50

55

Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de desarrollar un microorganismo degradador de celulosa (por ejemplo, modificado por ingeniería genética *T. reesei*) capaz de mejorar la actividad enzimática al tiempo que acorta el período de fermentación, reduciendo, de este modo, en gran medida los costos de producción y mejorando la competitividad de la celulasa.

60 **Breve resumen de la invención**

El método de la presente invención puede mejorar el rendimiento de la enzima β -glucosidasa y al mismo tiempo acortar el período de producción de la enzima, abordar el largo período de fermentación, el bajo rendimiento de β -glucosidasa en *T. reesei* y las otras deficiencias en la técnica anterior, y por lo tanto es de importante trascendencia en la mejora de la eficacia de degradación de celulosa, en los usos eficientes de residuos de celulosa en producciones energéticas y en la resolución de la crisis energética actual.

65

En el primer aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión o secuencia codificante de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 4.

- 5 En el segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante, de acuerdo con la reivindicación 5.

En algunas realizaciones de la presente invención, el vector de expresión recombinante comprende además uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en:

- 10 (i) un promotor, tal como los promotores de celobiohidrolasa I (Cbhl) de *T. reesei* (*p.ej.*, el promotor de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1), celobiohidrolasa II (CbhII) de *T. reesei*, endoglucanasa I de *T. reesei*, endoglucanasa II de *T. reesei*, endoglucanasa III de *T. reesei*, endoglucanasa IV de *T. reesei*, endoglucanasa V de *T. reesei*, promotor de β -xilanasas de *T. reesei*, promotor de β -glucosidasa de *T. reesei*, promotor de amilasa TATA de *Aspergillus oryzae*, promotor de proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae*, promotor neutro de α -amilasa de *A. niger*, promotor de glucoamilasa de *A. Níger*, promotor de proteasa aspártica *Rhizomucor miehei*; en levaduras, los promotores útiles incluyen: promotor de enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, promotor de galactocinasa de *S. cerevisiae*, promotor de la alcohol deshidrogenasa/promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, promotor de 3-fosfoglicerato cinasa de *S. cerevisiae*;
- 15 (ii) una secuencia codificante de un péptido señal, tal como las secuencias codificantes del péptido señal de celobiohidrolasa I (Cbhl) de *T. reesei* (*p.ej.*, la secuencia codificante como se expone en la SEQ ID NO: 2), péptido señal de amilasa de *A. oryzae*, péptido señal de glucoamilasa de *A. Níger*, péptido señal de proteasa aspártica de *R. miehei*;
- 20 (iii) una secuencia codificante de una secuencia líder, tal como la secuencia SD que se une al ribosoma en procariotas para iniciar el proceso de traducción en sistemas de expresión procariotas, o la secuencia de aminoácidos fusionada en marco al extremo amino de un polipéptido para formar una proenzima o polipéptido;
- 25 (iv) un terminador, tal como terminador de celobiohidrolasa I (Cbhl) de *T. reesei* (*p.ej.*, el terminador de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 6), terminador de amilasa de *A. oryzae*, terminador de glucoamilasa de *A. Níger*, terminador de antranilato sintasa de *A. nidulans*;
- 30 (v) un gen marcador, tal como el gen de orotidina-5-fosfato descarboxilasa (pyrG), de higromicina fosfotransferasa (hph), el gen de acetamidasa de *A. nidulans* (amdS), gen de ornitina carbamoil transferasa (argB), nitrato reductasa (niaD), antranilato sintasa (trpC);
- 35 (vi) una secuencia de poliadenilación, *p.ej.*, la secuencia de poliadenilación obtenida del gen de enzimas seleccionadas del grupo que consiste en TAKA amilasa de *A. oryzae*, glucoamilasa de *A. Níger*, antranilato sintasa de *A. nidulans* y α -glucosidasa de *A. Níger*; así como el factor similar a la proteína de unión al potenciador CCAAT (C/EBP, por sus siglas en inglés), factor de transcripción GATA y similares; y
- (vii) un activador transcripcional, tal como HvCBF2 (factor 2 de unión repetición C/ DRE) en cebada (*Hordeum vulgare*) (Xue et al., 2003).

- 40 En algunas realizaciones de la presente invención, el esqueleto básico del vector de expresión recombinante deriva del plásmido pCambia1300, plásmido pCambia3300, plásmido pCambia1301, o plásmido pBin19; preferentemente, el vector de expresión recombinante es pAZ193.

- 45 En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma en el aspecto anterior se selecciona del grupo que consiste en: la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma derivada de un microorganismo degradador de celulosa, por ejemplo, derivada de *Trichoderma* (tal como *T. harzianum*, *T. reesei*), *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Botrytis*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*. Preferentemente, la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7 o la secuencia homóloga de las mismas o la secuencia derivada de las secuencias de aminoácidos anteriores por sustitución, delección o adición de al menos un aminoácido, preferentemente las secuencias obtenidas tras la sustitución conservativa de al menos un aminoácido.

- 55 En algunas realizaciones de la presente invención, la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7, o está codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología con la secuencia de nucleótidos codificante como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7. En realizaciones preferidas, la proteasa aspártica está codificada por la secuencia de nucleótidos codificante como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7. En realizaciones más preferidas, la proteasa aspártica comprende o consiste en la secuencia codificada por secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7.

- 65 En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia codificante de la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma en el aspecto anterior se selecciona del grupo que consiste en: las secuencias codificantes de la β -

glucosidasa o fragmento activo de la misma derivada de un microorganismo degradador de celulosa, por ejemplo, derivada de *Trichoderma* (tal como *T. harzianum*, *T. reesei*), *Penicillium*, *Aspergillus* (tal como *A. niger*, *A. oryzae*), *Mucor*, *Botrytis*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*. Preferentemente, la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma comprende la

5 secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 o las secuencias derivadas de la secuencia de aminoácidos anterior por sustitución, delección o adición de al menos un aminoácido, preferentemente las secuencias obtenidas tras la sustitución conservativa de al menos un aminoácido. Preferentemente, la secuencia codificante de la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma es el gen Bgll, más

10 preferentemente el gen es el gen Bgll de β -glucosidasa de *T. reesei*, *p.ej.*, que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de la presente invención, la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %

15 de homología con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 o está codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología con la secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5. En realizaciones preferidas, la β -glucosidasa está codificada por la secuencia de nucleótidos codificante

20 de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5. En realizaciones más preferidas, la β -glucosidasa comprende o consiste en la secuencia codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5.

En el tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende la secuencia codificante de la presente invención o el vector de expresión recombinante de la presente invención.

25 Preferentemente, la célula hospedadora es *E. coli*, levadura (tal como *S. cerevisiae*, levadura *Pichia*) y *Agrobacterium* (tal como *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*).

En el cuarto aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo degradador de celulosa recombinante, caracterizado porque el vector de expresión recombinante de la presente invención se transforma en un

30 microorganismo degradador de celulosa o en la célula hospedadora de la presente invención, expresando, de este modo, de forma recombinante las secuencias codificantes de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma y de la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma. Preferentemente, el microorganismo degradador de celulosa deriva de *Trichoderma* (tal como *T. harzianum*, *T. reesei*), *Aspergillus* (tal como *A. Níger*, *A. oryzae*), *Penicillium* más preferentemente, el microorganismo degradador de celulosa deriva de *T. reesei* ATCC56765 o es *T. reesei*

35 ATCC56765.

En algunas realizaciones de la presente invención, en las mismas condiciones de fermentación, la actividad de la β -glucosidasa del microorganismo degradador de celulosa recombinante es de 2 a 20 veces, preferentemente de 3 a 10 veces mayor que la del microorganismo degradador de celulosa sin ingeniería genética; y/o, el período de fermentación

40 de la celulasa del microorganismo degradador de celulosa recombinante es más corto que el del microorganismo degradador de celulosa sin ingeniería genética. Preferentemente, el período de fermentación dura tan solo de 1 a 3 días para el microorganismo degradador de celulosa recombinante.

En el quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar el microorganismo degradador de celulosa recombinante de la invención, el método comprende las etapas de:

45

- (i) proporcionar el vector de expresión recombinante o la célula hospedadora recombinante de la presente invención;
- (ii) transformar un microorganismo degradador de celulosa con el vector de expresión recombinante o el

50 hospedador recombinante en condiciones adecuadas para la transformación, para obtener el microorganismo degradador de celulosa recombinante de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, el método comprende además (iii) explorar, aislar, recoger, cultivar, propagar y/o usar el microorganismo degradador de celulosa transformado.

55

En algunas realizaciones de la invención, el método comprende además explorar la célula hospedadora recombinante y/o el microorganismo degradador de celulosa recombinante para determinar el gen marcador en el vector de expresión recombinante.

En algunas realizaciones de la invención, la transformación en la etapa (ii) se lleva a cabo mediante el método seleccionado del grupo que consiste en transformación mediada por *Agrobacterium* (tal como usar *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*), método de transformación mediada por pistola génica, método de transformación por electroporación, método de transformación asistido por ultrasonido, método de transformación *in situ*, método de microinyección nuclear.

60

En algunas realizaciones de la invención, el microorganismo degradador de celulosa recombinante se utiliza para la

65

degradación de la celulosa directamente sin aislamiento, o después del aislamiento, recogida, cultivo y/o propagación.

5 En el sexto aspecto, la invención proporciona un método para degradar un material celulósico o celobiosa, comprendiendo el método poner en contacto una cantidad eficaz de la proteína de fusión de la presente invención, una cantidad eficaz del microorganismo degradador de celulosa recombinante de la presente invención y/o una cantidad eficaz del microorganismo degradador de celulosa recombinante preparado por el método de la presente invención con el material celulósico o celobiosa en condiciones adecuadas para la degradación del materia celulósico o la celobiosa.

10 En algunas realizaciones de la invención, el material celulósico y/o la celobiosa se ha sometido o no a un tratamiento previo (tal como aislamiento, trituración, impregnación, tratamiento enzimático previo (por ejemplo, degradado en celobiosa por tratamiento enzimático)) antes del contacto con la célula hospedadora o el microorganismo degradador de celulosa modificado por ingeniería genética. La degradación se lleva a cabo mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en fermentación en estado sólido, fermentación sumergida líquida, fermentación discontinua, fermentación continua y fermentación discontinua alimentada.

15 En algunas realizaciones de la invención, el material celulósico se selecciona del grupo que consiste en residuos agrícolas, residuos forestales, desechos sólidos urbanos, papel de desecho y residuos de fábricas de pulpa y papel, tal como de madera, tallo de maíz, algodón, salvado de trigo, borra de algodón, grano, paja de trigo, paja de arroz, carrizo, cáñamo, corteza de morera, corteza de morera, bagazo, etc.

20 En el séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para la expresión recombinante de la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma, comprendiendo el método: proporcionar el microorganismo degradador de celulosa recombinante de la invención; expresar la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma en condiciones adecuadas para la expresión del microorganismo degradador de celulosa recombinante.

25 La invención proporciona además un método para aumentar el rendimiento de la β -glucosidasa y acortar el período de producción de la enzima, comprendiendo el método una etapa de producción de la β -glucosidasa con el microorganismo degradador de celulosa recombinante de la invención mediante fermentación.

30 Otros aspectos de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a la vista de la divulgación en el presente documento.

35 Breve descripción de los dibujos

La presente invención se ilustra adicionalmente a continuación junto con los dibujos adjuntos, en donde estas ilustraciones son solo para ilustrar las realizaciones de la presente invención, pero no para limitar el alcance de la presente invención.

40 Fig. 1: La construcción del vector de expresión pAZ189, en el que hph representa el gen de resistencia a higromicina.

Fig. 2: La construcción del vector de expresión de fusión pAZ193, en el que hph representa el gen de resistencia a higromicina.

45 Fig. 3: La construcción del vector de expresión pAZ301, en el que hph representa el gen de resistencia a higromicina.

Fig. 4: Ensayo de la actividad enzimática de la β -glucosidasa a partir de *Trichoderma reesei* transformado con pAZ189 (B1, B2, B3, B4, B5, B6) y *Trichoderma reesei* transformado con pAZ193 (FB2). En la figura, C30 representa RUT-C30 de *T. reesei*.

50 Fig. 5: Ensayo de la actividad enzimática de la β -glucosidasa a partir de *Trichoderma reesei* transformado con pAZ189 (B1, B2, B3, B4, B5 y B6) y *Trichoderma reesei* transformado con pAZ301 (PB2). En la figura, C30 representa RUT-C30 de *T. reesei*.

Descripción detallada de la invención

55 Se ha divulgado en las técnicas anteriores que la proteasa aspártica puede influir en la expresión de proteínas heterogéneas en cepas recombinantes (véase, por ejemplo: MA Ten, Breeding of *Trichoderma niger* strains overproducing heat-resistant β -glucosidase and gene cloning thereof, master's thesis, Hebei Normal University of Science & Technology, Junio de 2012; ZHU Huiyuan, Specific gene expression analysis in *Trichoderma niger* under xylanase inducing conditions and construction of chrysoconium strain over-expressing alkaline xylanase, Shandong University, tesis doctoral, Octubre de 2010).

65 Sin embargo, a través de un estudio a largo plazo y en profundidad, los presentes inventores han encontrado inesperadamente que: uniendo la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma al gen BgII de la β -glucosidasa mediante manipulaciones de ingeniería genética para formar un vector de expresión y transformando un microorganismo recombinante con el vector de expresión resultante, no influye en la expresión de BgII de β -glucosidasa, en cambio, acorta el período de fermentación del microorganismo recombinante, mejora su

actividad enzimática y mejora significativamente su degradación de la celulosa.

Todos los intervalos numéricos proporcionados en el presente documento tienen la intención de incluir claramente todos los números que se encuentran entre los puntos finales de los intervalos y los intervalos numéricos entre ellos.

5 Las características mencionadas por la presente invención y las mencionadas en los Ejemplos pueden combinarse. Todas las características divulgadas en la memoria descriptiva se pueden usar en combinación con cualquier forma de composición y cada característica divulgada en la memoria descriptiva se puede reemplazar con la característica alternativa que se puede proporcionar para el mismo, equivalente o similar propósito. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, las características divulgadas son solo ejemplos generales de las características equivalentes o similares.

10 Como se usa en el presente documento, "que contiene", "que tiene" o "que incluye" incluye "que comprende", "que consiste principalmente en...", "que consiste esencialmente en..." y "que consiste en..."; "que consiste principalmente en...", "que consiste esencialmente en..." y "que consiste en..." pertenecen a los conceptos específicos de "que contiene", "que tiene" o "que incluye".

Proteasa aspártica o fragmentos activos de la misma

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteasa aspártica" se refiere a una clase de enzimas proteolíticas importantes, cuyo centro activo comprende un resto de ácido aspártico catalítico.

25 La proteasa aspártica de la invención puede ser: una proteína o polipéptido codificado por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7, una secuencia homóloga que tiene la función hidrolítica similar a dicha proteína o polipéptido (*p.ej.*, una secuencia homóloga obtenida por una base de datos o programa informático de alineación conocidos en la técnica), una variante o una forma modificada de la misma. Por ejemplo, la proteasa aspártica puede seleccionarse del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7; (b) una proteína o polipéptido derivado de (a) por sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos como se define en (a) y que tiene una función hidrolítica similar; o (c) otras secuencias de aminoácidos que tienen una actividad proteasa aspártica, *p.ej.*, la secuencia homóloga a la secuencia codificada por la SEQ ID NO: 3 o 7. La proteasa aspártica de la invención está codificada preferentemente por el gen de la β -glucosidasa o el gen homólogo o el gen de la familia del mismo de los microorganismos degradadores de celulosa (tales como *Trichoderma* (*p.ej.*, *T. harzianum*, *T. reesei*).

35 La forma variante de la proteína o polipéptido de la invención incluye (pero sin limitación): delección, inserción y/o sustitución de uno o más (generalmente 1-50, preferentemente 1-30, más preferentemente 1-20, lo más preferentemente 1-10, *p.ej.*, preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos, así como la adición de uno o más (generalmente dentro de 20, preferentemente dentro de 10, más preferentemente dentro de 5) aminoácidos en el extremo C y/o el extremo N. Por ejemplo, se sabe en la técnica que la sustitución entre aminoácidos con propiedades cercanas o similares generalmente no alteraría las funciones de proteínas o polipéptidos. Como otro ejemplo, la adición de uno o varios aminoácidos en el extremo C y/o el extremo N generalmente no alteraría la función de la proteína o polipéptido. Por ejemplo, la proteasa aspártica de la presente invención puede o no incluir un resto de metionina inicial mientras todavía tiene actividad proteolítica.

45 La forma variante del polipéptido comprende además: secuencia homóloga, variante conservativa, variante alélica, mutante natural, mutante inducido, una proteína codificada por una secuencia que puede hibridar con la secuencia codificante de proteasa aspártica en condiciones de alta o baja rigurosidad.

50 La proteasa aspártica o fragmento activo de la misma de la invención comprende una secuencia de aminoácidos homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7, o está codificada por la secuencia homóloga a la secuencia de nucleótidos codificante como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7. Por ejemplo, la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología con la secuencia codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7, o está codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología con la secuencia de nucleótidos codificante como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7. En realizaciones preferidas, la proteasa aspártica está codificada por la secuencia de nucleótidos codificante como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7. En realizaciones más preferidas, la proteasa aspártica comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos codificada por secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7.

65 Además del polipéptido casi de longitud completa, la presente invención contempla además un fragmento soluble de la proteasa aspártica, siempre que también tenga una actividad proteolítica similar. En general, el fragmento tiene al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, generalmente al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos, más preferentemente al menos aproximadamente 80 aminoácidos contiguos, más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos

contiguos de la secuencia de la proteasa aspártica.

Dependiendo del hospedador utilizado en el protocolo de producción recombinante, la proteína o polipéptido de la presente invención puede estar glicosilada o estar no glicosilada.

5 La proteasa aspártica de la presente invención incluye además el fragmento activo y el derivado activo de la proteasa aspártica, *p.ej.*, la forma variante y el fragmento activo de la proteasa aspártica como se describe anteriormente. En comparación con la proteasa aspártica, el fragmento activo y el derivado activo de la proteasa aspártica tiene al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, más
10 preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % de la actividad proteasa aspártica.

15 La actividad proteasa aspártica se puede determinar usando *p.ej.*, el método modificado de Anson, en el que: 0,25 ml de la solución de muestra de la enzima a determinar se mezcla con 0,25 ml de caseína al 1 % (disuelta en ácido láctico 0,05 M - tampón de lactato de sodio, pH 3,0), y se incuba a 40 °C durante 10 min. La reacción se termina después añadiendo 0,5 ml de ácido tricloroacético al 10 %, y se centrifuga a 12.000 g durante 5 min. El sobrenadante se mide por la absorbancia a 280 nm.

20 Definición de unidad de actividad de la enzima: 1 unidad de actividad proteasa aspártica se define como la cantidad de la enzima que hidroliza la caseína en 1 ml de líquido para producir 1 microgramo de tirosina por minuto en condiciones de 0 °C y pH 3,0, y se expresa en U/ml.

Beta-glucosidasa o fragmentos activos de la misma

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "β-glucosidasa" se refiere a un componente importante en el sistema enzimático celulolítico, que es capaz de hidrolizar el β-D-glucósido no reductor del extremo, mientras libera β-D-glucosa y el ligando correspondiente.

30 La β-glucosidasa de la invención puede ser: una proteína o polipéptido codificado por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5, una secuencia homóloga que tiene la función hidrolítica similar a dicha proteína o polipéptido (*p.ej.*, una secuencia homóloga obtenida por una base de datos o programa informático de alineación conocidos en la técnica), una variante o una forma modificada de la misma. Por ejemplo, la β-glucosidasa puede seleccionarse del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5; (b) una proteína o polipéptido derivado de (a) por sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos en
35 la secuencia de aminoácidos como se define en (a) y que tiene actividad β-glucosidasa; o (c) otras secuencias de aminoácidos que tienen actividad β-glucosidasa, *p.ej.*, la secuencia homóloga a la secuencia codificada por la SEQ ID NO: 5. La β-glucosidasa de la invención está codificada preferentemente por el gen de la β-glucosidasa o el gen homólogo o el gen de la familia del mismo del microorganismo degradador de celulosa (tal como *Trichoderma (p.ej., T. harzianum, T. reesei)*).

40 La forma variante de la proteína o polipéptido de la invención incluye (pero sin limitación): delección, inserción y/o sustitución de uno o más (generalmente 1-50, preferentemente 1-30, más preferentemente 1-20, lo más preferentemente 1-10, *p.ej.*, preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos, así como la adición de uno o más (generalmente dentro de 20, preferentemente dentro de 10, más preferentemente dentro de 5) aminoácidos en
45 el extremo C y/o el extremo N. Por ejemplo, se sabe en la técnica que la sustitución entre aminoácidos con propiedades cercanas o similares generalmente no alteraría las funciones de proteínas o polipéptidos. Como otro ejemplo, la adición de uno o varios aminoácidos en el extremo C y/o el extremo N generalmente no alteraría la función de la proteína o polipéptido. Por ejemplo, la β-glucosidasa de la presente invención puede o no incluir un resto de metionina inicial mientras todavía tiene actividad β-glucosidasa.

50 La forma variante del polipéptido comprende además: secuencia homóloga, variante conservativa, variante alélica, mutante natural, mutante inducido, una proteína codificada por una secuencia que puede hibridar con la secuencia codificante de β-glucosidasa en condiciones de alta o baja rigurosidad.

55 La β-glucosidasa o fragmento activo de la misma de la invención comprende una secuencia de aminoácidos homóloga a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5, o está codificada por la secuencia homóloga a la secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la β-glucosidasa o fragmento activo de la misma comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos
60 el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología con la secuencia codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 o está codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 %, preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de homología con la secuencia de nucleótidos codificante como se expone en la SEQ ID NO: 5. En realizaciones preferidas, la β-glucosidasa está
65 codificada por la secuencia de nucleótidos codificante como se expone en la SEQ ID NO: 5. En realizaciones más preferidas, la proteasa aspártica comprende o consiste en la secuencia codificada por la secuencia como se expone

en la SEQ ID NO: 5.

Además del polipéptido casi de longitud completa, la presente invención contempla además un fragmento soluble de la β -glucosidasa, siempre que también tenga una actividad β -glucosidasa similar. En general, el fragmento tiene al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, generalmente al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos, más preferentemente al menos aproximadamente 80 aminoácidos contiguos, más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de la β -glucosidasa.

Dependiendo del hospedador utilizado en el protocolo de producción recombinante, la proteína o polipéptido de la presente invención puede estar glicosilada o estar no glicosilada.

La β -glucosidasa de la presente invención comprende además el fragmento activo y el derivado activo de la β -glucosidasa, p. ej., la forma variante y el fragmento activo de la β -glucosidasa como se describe anteriormente. En comparación con la β -glucosidasa, el fragmento activo y el derivado activo de la β -glucosidasa tiene al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % de la actividad β -glucosidasa. La actividad β -glucosidasa se mide por el método descrito por *p.ej.*, Venturi et al., Extracellular P-D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties, J. Basic Microbiol. 2002(42): 55-66.

Secuencia Codificante

Como se usa en el presente documento, los términos "gen", "secuencia codificante" o "secuencia codificante de proteína/polipéptido" se usan indistintamente, y todas se refieren a una secuencia que codifica la proteína o polipéptido deseado o fragmento activo de la misma de la invención (*p.ej.*, proteasa aspártica o fragmento activo de la misma, β -glucosidasa o fragmento activo de la misma).

Para la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma, la secuencia codificante de la misma puede ser, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7, la molécula hibridada a estas secuencias en condiciones estrictas o la molécula génica de la familia altamente homóloga a las moléculas anteriores, en donde la expresión del gen puede producir la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma, que se fusiona con la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma. Por ejemplo, la secuencia codificante de la proteasa aspártica de la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: (i) la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 3 o 7; o (ii) las moléculas hibridadas con la secuencia como se define en (i) en condiciones estrictas y que codifican un polipéptido que tiene actividad proteasa aspártica.

Para la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma, la secuencia codificante de la misma puede ser *p.ej.*, la secuencia Bfl1 de *T. reesei* como se expone en la SEQ ID NO: 5, la molécula hibridada a estas secuencias en condiciones estrictas o la molécula génica de la familia altamente homóloga a las moléculas anteriores, en donde la expresión del gen puede producir la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma, que se fusiona con la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma. Por ejemplo, la secuencia codificante de la β -glucosidasa de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: (i) la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 5; o (ii) la molécula hibridada con la secuencia como se define en (i) en condiciones estrictas y que codifica un polipéptido que tiene actividad β -glucosidasa.

La secuencia codificante del fragmento de fusión de la invención puede comprender al menos una copia (*p.ej.*, 1 a 20 copias, 1 a 10 copias, etc.) de la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma y al menos una copia (*p.ej.*, 1 a 20 copias, 1 a 10 copias, etc.) de la secuencia codificante de β -glucosidasa Bg11 o fragmento activo de la misma.

En la secuencia codificante del fragmento de fusión de la presente invención, la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma puede localizarse cadena arriba o cadena abajo de la secuencia codificante de la β -glucosidasa Bg11 o fragmento activo de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "condición estricta" se refiere a: (1) procesos de hibridación y lavado a fuerzas iónicas más bajas y temperaturas más altas, tal como, 0,2xSSC, SDS al 0,1 %, 60 °C; o (2) hibridación con desnaturizante añadido, tal como, formamida al 50 % (v/v), suero de ternera al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %, 42 °C, etc.; o (3) hibridación producida únicamente cuando la identidad entre dos secuencias es al menos del 50 %, preferentemente 55 % o más, 60% o más, 65 % o más, 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, 85 % o superior o 90 % o superior, más preferentemente 95 % o superior. Por ejemplo, la secuencia puede ser la secuencia complementaria a la secuencia como se define en (a).

La secuencia de longitud completa o fragmento de la misma de la secuencia codificante de la invención se puede obtener generalmente mediante amplificación por PCR, métodos de recombinación o síntesis artificial. Para el método

de amplificación por PCR, los cebadores pueden diseñarse de acuerdo con las secuencias de nucleótidos relevantes divulgadas en la invención, especialmente las secuencias del marco abierto de lectura y se usan en la amplificación usando una biblioteca de ADNc disponible comercialmente o una biblioteca de ADNc preparada por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia como plantillas para producir secuencias relacionadas. Para una secuencia más larga, normalmente requiere realizar dos o más amplificaciones por PCR y después unir cada fragmento amplificado en un orden correcto.

Las secuencias codificantes de la invención derivan preferentemente de microorganismos degradadores de celulosa. Los otros genes derivados de los otros microorganismos y que tienen una identidad alta (tal como una identidad de secuencia del 50 % o más alta, preferentemente 55% o más alta, 60 % o más alta, 65 % o más alta, 70 % o más alta, 75 % o más alta, 80 % o más alta, más preferentemente 85 % o más alta, tal como el 85 %, 90 %, 95 %, 98% o incluso 99 % o más alta) con la secuencia codificante correspondiente en los microorganismos degradadores de celulosa también están dentro del alcance equivalente contemplado preferentemente en la presente invención. Los métodos y herramientas para la alineación de secuencias y el cálculo de la similitud entre ellas también son bien conocidos en la técnica, tal como BLAST con los parámetros predeterminados del mismo.

Vectores de expresión recombinantes, hospedador de expresión recombinante y microorganismo degradador de celulosa recombinante

La presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma y la secuencia codificante de la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma, una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante y un microorganismo degradador de celulosa recombinante obtenido por transformación.

Por la técnica convencional de ADN recombinante (Science, 1984; 224: 1431), puede usarse la secuencia codificante de la presente invención para expresar o producir la proteína recombinante. Por ejemplo, puede comprender las siguientes etapas:

- (1) transformar o transducir una célula hospedadora adecuada con el vector de expresión recombinante de la invención y transformar el microorganismo degradador de celulosa con la célula hospedadora; o transformar directamente la cepa diana (p.ej, el microorganismo degradador de celulosa) con el vector de expresión recombinante de la presente invención para obtener un microorganismo degradador de celulosa recombinante;
- (2) aislar, recoger, cultivar, propagar y/o usar el microorganismo degradador de celulosa recombinante transformado directa o indirectamente con el vector de expresión recombinante.

En la presente invención, las expresiones "vector" y "vector de expresión recombinante" pueden usarse indistintamente, y se refieren al plásmido bacteriano, bacteriófago, plásmido de levadura, virus celular u otros vectores bien conocidos en la técnica. En resumen, se pueden usar cualquier plásmido y vector, siempre que puedan replicarse y ser estables en el hospedador. Como una característica importante, el vector de expresión generalmente contiene un origen de replicación, un promotor, un gen marcador y un elemento de control de traducción.

Los métodos bien conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir un vector de expresión que contenga la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma y la secuencia codificante de la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma, y las señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen técnica de ADN recombinante *in vitro*, técnica de síntesis de ADN, técnica de recombinación *in vivo* y similares. La secuencia de ADN puede estar operativamente unida a un promotor apropiado en el vector de expresión para dirigir la síntesis de ARNm. El vector de expresión incluye adicionalmente un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. La presente invención usa preferentemente el promotor cbhl, el vector promotor cbhl y el sistema de expresión de *T. reesei*.

Además, el vector de expresión preferentemente comprende uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedadoras transformadas, tal como el gen de resistencia a higromicina para el proceso de cribado con higromicina, dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina y proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) para cultivo de células eucariotas, o resistencia a tetraciclina o ampicilina para *E. coli*.

Se puede usar un vector que comprende las secuencias de ADN apropiadas y las secuencias de promotor o control apropiadas anteriores para transformar una célula hospedadora apropiada, que puede usarse a su vez para transformar un microorganismo diana apropiado para dotar al microorganismo diana de una actividad degradadora de celulosa deseada. La célula hospedadora puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana; o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura. Los ejemplos representativos incluyen: *E. coli*, *Streptomyces spp.*, *Agrobacterium spp.* (como *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*); células fúngicas, tales como levadura y similares. En la presente invención, se prefiere usar *Agrobacterium* (p.ej, *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*) como célula hospedadora. Todos los expertos en la materia saben cómo elegir el vector, promotor, potenciador y célula hospedadora apropiados.

En la presente invención, la expresión "microorganismo degradador de celulosa recombinante" se refiere a un

microorganismo transformado con la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma y con la secuencia codificante de la β -glucosidasa o fragmento activo de la misma, y que expresa de manera estable las proteínas o polipéptidos, preferentemente el "microorganismo degradador de celulosa" posee en sí mismo la actividad degradadora de celulosa.

5 En el método anterior, el polipéptido recombinante puede expresarse intracelularmente o en la membrana o secretarse fuera de la célula. Si se desea, la proteína recombinante puede aislarse y purificarse mediante diversos métodos de aislamiento de acuerdo con sus propiedades físicas, químicas y otras propiedades. Estos métodos de hibridación son bien conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos de dichos métodos incluyen, pero sin limitación: tratamiento de renaturalización convencional, tratamiento con precipitantes de proteínas (precipitación de proteínas por adición de sal), centrifugación, lisis osmótica, tratamiento de ultrasonido, ultracentrifugación, cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y otras diversas técnicas de cromatografía de líquidos y la combinación de los mismos.

15 Actividad degradadora de celulosa

Como se usa en el presente documento, la expresión "material celulósico" se refiere a cualquier material que contenga celulosa. Generalmente, la celulosa se puede encontrar en *p.ej.* tallo, hoja, cáscara, corteza y mazorca de plantas o en hojas, rama y xilema de árboles. El material celulósico también puede ser, pero sin limitación, material herbáceo, residuo agrícola, residuo forestal, desecho sólido urbano, papel de desecho y residuo de fábricas de pulpa y papel. Debe apreciarse que la celulosa en el presente documento puede estar en forma de lignocelulosa, *es decir*, materiales de la pared celular vegetal que contienen lignina, celulosa y hemicelulosa en una matriz mixta.

En un aspecto preferido, el material celulósico son tallos de maíz. En otro aspecto preferido, el material celulósico es fibra de maíz. En otro aspecto preferido, el material celulósico es paja de arroz. En otro aspecto preferido, el material celulósico es desecho de procesamiento de papel y pulpa. En otro aspecto preferido, el material celulósico es planta leñosa o herbácea. En otro aspecto preferido, el material celulósico es bagazo.

El material celulósico puede usarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. El material celulósico se trata previamente o se puede tratar previamente. Por ejemplo, las técnicas de tratamiento previo físico pueden incluir diversos tipos de trituración, irradiación, vapor/explosión de vapor y descomposición por calor húmedo; las técnicas de tratamiento previo químico pueden incluir usos de ácidos diluidos, álcali, disolventes orgánicos, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono y descomposición con calor húmedo y pH controlado; y las técnicas de tratamiento previo biológico pueden incluir usos de microorganismos degradadores de lignina.

En el presente documento, el término "fermentación" se refiere al proceso de degradación de un material celulósico o el derivado del mismo (tal como la celobiosa) usando el microorganismo degradador de celulosa recombinante de la presente invención. El proceso puede realizarse utilizando el equipo y la tecnología de fermentación convencionales en la técnica, y el equipo y la tecnología pueden seleccionarse por los expertos en la materia de acuerdo con las necesidades y condiciones reales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad degradadora de celulosa" se refiere a la actividad biológica de hidrolizar materiales de celulosa, implica principalmente, entre otros, la cantidad y/o actividad de la enzima limitante de la velocidad del proceso de degradación de la celulosa (*es decir*, β -glucosidasa), duración del período de fermentación y similares. La expresión "actividad degradadora de celulosa mejorada" significa que el microorganismo degradador de celulosa modificado por ingeniería genética tiene más β -glucosidasa, mayor actividad β -glucosidasa, y/o período de fermentación más corto, en comparación con el microorganismo degradador de celulosa sin ingeniería genética.

50 Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, la actividad β -glucosidasa del microorganismo degradador de celulosa recombinante es de 2 a 20 veces, preferentemente de 3 a 10 veces mayor que la del microorganismo degradador de celulosa sin ingeniería genética; y/o, el período de fermentación degradadora de celulosa del microorganismo degradador de celulosa recombinante es más corto que el del microorganismo degradador de celulosa sin ingeniería genética. Preferentemente, el período de fermentación degradadora de celulosa del microorganismo degradador de celulosa recombinante de la presente invención es tan solo de 1 a 3 días.

Como se usa en el presente documento, "el microorganismo degradador de celulosa sin ingeniería genética" se refiere a un microorganismo degradador de celulosa por lo demás el mismo que el microorganismo degradador de celulosa recombinante de la presente invención, excepto que no se ha sometido a transformación con el vector de expresión recombinante de la presente invención. El microorganismo degradador de celulosa puede ser o derivar de *Trichoderma reesei* ATCC56765 o *Trichoderma reesei* ATCC56765, pero sin limitarse a los mismos.

Las realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención

65 Lo siguiente es una realización ejemplar de la presente invención. Debe entenderse que todas las características divulgadas en la misma pueden usarse en combinación con las otras formas de la presente invención, y cada

característica divulgada en la misma puede reemplazarse con la característica alternativa que puede proporcionarse para el mismo, equivalente o similar propósito. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, las características divulgadas son simplemente los ejemplos generales de las características equivalentes o similares.

5 A. Fuentes de fragmentos de fusión

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de fusión" se refiere a un producto de fusión de proteasa aspártica o fragmento activo de la misma y de β -glucosidasa Bgll o fragmento activo de la misma. La proteasa aspártica en el fragmento de fusión puede ser, por ejemplo: la proteasa aspártica codificada por el gen p6281 (SEQ ID NO: 7) en la base de datos NCBI, o la proteasa aspártica codificada por la secuencia F1 (SEQ ID NO: 3), que tiene una identidad de secuencia del 99 % con la secuencia codificante del gen p6281.

El fragmento de fusión de la invención puede comprender al menos una copia (*p.ej.*, 1 a 20 copias, 1 a 10 copias, etc.) de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma y de la β -glucosidasa Bgll o fragmento activo de la misma. En consecuencia, la secuencia codificante del fragmento de fusión de la presente invención puede comprender al menos una copia (*p.ej.*, 1 a 20 copias, 1 a 10 copias, etc.) de la secuencia codificante.

En el fragmento de fusión de la presente invención, la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma puede localizarse cadena arriba o cadena abajo de la β -glucosidasa Bgll o fragmento activo de la misma. En consecuencia, en la secuencia codificante del fragmento de fusión de la presente invención, la secuencia codificante de la proteasa aspártica o fragmento activo de la misma puede localizarse cadena arriba o cadena abajo de la secuencia codificante de la β -glucosidasa Bgll o fragmento activo de la misma.

25 B. Construcción del vector de expresión de BGL1 de *Trichoderma reesei*

Siguiendo el método descrito en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (tercera edición, Academic Press, 2002, [US] editado por J. Sambrook, et. al., y traducido por Peitang HUANG), basado en pCambia1300 (disponible comercialmente de Invitrogen), el promotor Cbhl, el péptido señal Cbhl, el gen Bgll y el terminador Cbhl se insertan secuencialmente en el sitio de clonación múltiple. Se construye el vector de expresión pAZ189 como se muestra en la Fig.1, que comprende: el promotor Cbhl, el péptido señal Cbhl, el gen Bgll y el terminador Cbhl.

Siguiendo el método descrito en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (tercera edición, Academic Press, 2002, [US] editado por J. Sambrook, et. al., y traducido por Peitang HUANG), basado en pCambia1300 (disponible comercialmente de Invitrogen), el promotor Cbhl, el péptido señal Cbhl, el fragmento de fusión F1, el péptido enlazador, el gen Bgll y el terminador Cbhl se insertan secuencialmente en el sitio de clonación múltiple. Se construye el vector de expresión pAZ193 como se muestra en la Fig.2, que comprende: el promotor Cbhl, el péptido señal Cbhl, el fragmento de fusión F1, el péptido enlazador, el gen Bgll y el terminador Cbhl.

Siguiendo el método descrito en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (tercera edición, Academic Press, 2002, [US] editado por J. Sambrook, et. al., y traducido por Peitang HUANG), basado en pCambia1300 (disponible comercialmente de Invitrogen), el promotor Cbhl, el péptido señal Cbhl, el fragmento de fusión p6281, el péptido enlazador, el gen Bgll y el terminador Cbhl se insertan secuencialmente en el sitio de clonación múltiple. Se construye el vector de expresión pAZ301 como se muestra en la Fig.3, que comprende: el promotor Cbhl, el péptido señal Cbhl, el fragmento de fusión p6281, el péptido enlazador, el gen Bgl1 y el terminador Cbhl.

45 C. Transformación de *Trichoderma reesei* RUT-C30 con los vectores de expresión pAZ189, pAZ193 y pAZ301

Trichoderma reesei (particularmente RUT-C30, disponible comercialmente de ATCC, *es decir*, ATCC56765) se transforma mediante el método de transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. El método específico hace referencia a de Groot, M. J. et al., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology, 1998(16): 839-842.

55 D. Ensayo de cribado y actividad enzimática en transformantes de los vectores de expresión pAZ193, pAZ189 o pAZ301

El método específico hace referencia a de Groot, M. J. et al., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology, 1998(16): 839-842.

Ensayo de Actividad Enzimática: la actividad β -glucosidasa es la actividad de la β -D-glucósido glucohidrolasa (EC3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis del resto β -D-glucosa terminal no reductor, mientras libera β -D-glucosa al mismo tiempo. La actividad β -glucosidasa se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito por Venturi, et al., (Extracellular β -D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties, J. Basic Microbiol. 2002(42): 55-66).

65 Una unidad de actividad enzimática de la glucosidasa se define como la cantidad de enzima que produce p-nitrofenol 1,0 μ M por minuto a partir del sustrato de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 4 mM en citrato de sodio 100 mM con

TWEEN® 20 al 0,01 % en las condiciones de 50 °C y pH 5.

Ventajas de la presente invención

- 5 El microorganismo degradador de celulosa recombinante de la presente invención puede expresar de manera eficaz la β -glucosidasa en un período de fermentación más corto (período de fermentación de solo 1 a 3 días) con una actividad enzimática significativamente mayor que la cepa original, superando, de este modo, las deficiencias de bajo nivel de expresión de la fermentación de β -glucosidasa en *T. reesei* y de largo período para la producción de enzimas (período de fermentación de hasta 5 a 8 días) en la técnica anterior.

10

Listado de secuencias

El número de ID de secuencia y el nombre de secuencia correspondiente de cada secuencia se muestran en la siguiente tabla:

15

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia
1	Secuencia del promotor Cbhl
2	Una secuencia codificante de péptido señal
3	secuencia codificante de F1
4	Una secuencia codificante de péptido enlazador
5	Secuencia de Bgl1 de <i>Trichoderma reesei</i>
6	secuencia del terminador Cbhl
7	secuencia codificante de p6281

Ejemplos

- 20 La presente invención se ilustrará adicionalmente a continuación en el presente documento junto con los ejemplos específicos. Debe entenderse que estos ejemplos son meramente ilustrativos de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Los expertos en la materia pueden hacer modificaciones y variaciones apropiadas a la presente invención, que están todas dentro del alcance de la presente invención.

- 25 En los siguientes ejemplos, los métodos convencionales en la técnica, o las condiciones recomendadas por el proveedor pueden utilizarse para el proceso experimental, para lo cual no se indican las condiciones específicas. Se pueden hacer referencias a, por ejemplo, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (tercera edición, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), y "Experiment Textbook of Biochemistry and Molecular Biology" (Editado por Songping LIANG, Higher Education Press). Los métodos de secuenciación de ADN son los métodos convencionales en la técnica o proporcionados por compañías comerciales.

30

- A menos que se indique lo contrario, los porcentajes y las partes se calculan en peso. A menos que se defina lo contrario, los significados de toda la terminología profesional y científica utilizada en el presente documento son los mismos que los familiares para los expertos en la materia. Además, los métodos y materiales que son similares o equivalentes a la presente divulgación son todos aplicables a los métodos de la invención. Los métodos y materiales incorporados preferidos son únicamente para fines a modo de ejemplo.

35

Ejemplo 1 Fuentes de la β -glucosidasa

- 40 Se usó *Trichoderma reesei* RUT-C30 (adquirido en ATCC, es decir, ATCC56765) para expresar β -glucosidasa. RUT-C30 se cultivó a 30 °C durante 5-7 días. Las placas de esporas se lavaron después con solución salina fisiológica al 0,8 %. La suspensión de esporas se recogió y se inoculó después en 50 ml de medio inductor de celulasa en matraces de agitación de vidrio de 250 ml. La composición del medio es la siguiente:
 (NH₄)₂SO₄ 5 g/l; Tampón MES 19,52 g/l; extracto de levadura (OXOID, N.º de Cat. LP0021) 9 g/l; KH₂PO₄ 4,5 g/l; CaCl₂·2H₂O 1,32 g/l; MgSO₄·7H₂O 1 g/l; antiespumante (adquirido en Nanjing Huaxing Defoamers Co.; N.º de Cat. xp-m-130) 5 ml/l; 400 x oligoelementos 2,5 ml/l pH 5,5; lactosa (esterilizada por separado) 40 g/l, en donde, las soluciones de 400 x oligoelementos son: ácido cítrico (anhidro) 175 g/l; FeSO₄·7H₂O 200 g/l; ZnSO₄·7H₂O 16 g/l; CuSO₄·5H₂O 3,2 g/l; MnSO₄·4H₂O 1,4 g/l; H₃BO₃ 0,8 g/l.

45

- 50 El cultivo se incubó a 30 °C con agitación a una velocidad constante de 200 rpm. Desde el día siguiente al inicio de la fermentación, se tomó 1 ml de cultivo de fermentación los días 2, 3, 4 y 6, se centrifugó a 12000 xg y se recogió el sobrenadante.

Ejemplo 2 Fuentes del fragmento de secuencia que codifica la proteasa aspártica

5 Las secuencias codificantes de la proteasa aspártica para la construcción del vector de expresión de la proteína de fusión son, respectivamente, las siguientes: (1) secuencia F1, sintetizada por Sangon Bioengineering (Shanghai) Ltd., que tiene el 99 % de identidad con el gen p6281 en la base de datos NCBI; (2) gen p6281 de la base de datos NCBI, sintetizado por Sangon Bioengineering (Shanghai) Ltd.

Ejemplo 3 Construcción del vector de expresión pAZ189 del gen de la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei*

10 Siguiendo el método descrito en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (tercera edición, Academic Press, 2002, [US] editado por J. Sambrook, et. al., y traducido por Peitang HUANG), basado en pCambia1300 (comprado en Invitrogen), el promotor Cbhl (SEQ ID NO: 1), la secuencia codificante del péptido señal Cbhl (SEQ ID NO: 2), el gen Bgl1 (SEQ ID NO: 5) y el terminador Cbhl (SEQ ID NO: 6) se insertaron secuencialmente en el sitio de clonación múltiple para construir el vector de expresión pAZ189 del gen de la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei*.

15 El vector de expresión comprende las siguientes secuencias: el promotor Cbhl, la secuencia codificante del péptido señal Cbhl, el gen Bgl1 y el terminador Cbhl. La estructura específica del vector se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 4 Construcción del vector de expresión pAZ193 del gen de la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei*

20 Siguiendo el método descrito en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (tercera edición, Academic Press, 2002, [US] editado por J. Sambrook, et. al., y traducido por Peitang HUANG), basado en pCambia1300 (comprado en Invitrogen), el promotor Cbhl (SEQ ID NO: 1), la secuencia codificante del péptido señal Cbhl (SEQ ID NO: 2), la secuencia codificante del fragmento de fusión F1 (SEQ ID NO: 3), la secuencia codificante del péptido enlazador (SEQ ID NO: 4), el gen Bgl1 (SEQ ID NO: 5) y el terminador Cbhl (SEQ ID NO: 6) se insertaron secuencialmente en el sitio de clonación múltiple para construir el vector de expresión pAZ193 del gen de la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei*.

30 El vector de expresión comprende: el promotor Cbhl, la secuencia codificante del péptido señal Cbhl, la secuencia codificante del fragmento de fusión F1, la secuencia codificante del péptido conector, el gen Bgl1 y el terminador Cbhl. La estructura específica del vector se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 5 Construcción del vector de expresión pAZ301 del gen de la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei*

35 Siguiendo el método descrito en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (tercera edición, Academic Press, 2002, [US] editado por J. Sambrook, et. al., y traducido por Peitang HUANG), basado en pCambia1300 (comprado en Invitrogen), el promotor Cbhl (SEQ ID NO: 1), la secuencia codificante del péptido señal Cbhl (SEQ ID NO: 2), la secuencia codificante del fragmento de fusión p6281 (SEQ ID NO: 7), la secuencia codificante del péptido enlazador (SEQ ID NO: 4), el gen Bgl1 (SEQ ID NO: 5) y el terminador Cbhl (SEQ ID NO: 6) se insertaron secuencialmente en el sitio de clonación múltiple para construir el vector de expresión pAZ301 del gen de la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei*.

45 El vector de expresión comprende: el promotor Cbhl, la secuencia codificante del péptido señal Cbhl, la secuencia codificante del fragmento de fusión p6281, la secuencia codificante del péptido conector, el gen Bgl1 y el terminador Cbhl. La estructura específica del vector se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 6 Transformación de *Trichoderma reesei* RUT-C30 con el vector de expresión de β -glucosidasa pAZ189

50 El vector de expresión pAZ189 se introdujo en la cepa RUT-C30 *Trichoderma reesei* por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (adquirida en Invitrogen). El método específico hace referencia a de Groot, M. J., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi., *Nature Biotechnology*, 1998(16): 839-842). Se obtuvieron alrededor de 200 transformantes en total.

Ejemplo 7 Transformación de *Trichoderma reesei* RUT-C30 con el vector de expresión de β -glucosidasa pAZ193

60 El vector de expresión pAZ193 se introdujo en la cepa *Trichoderma reesei* RUT-C30 por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1. El método específico hace referencia a de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P.J., Beijersbergen, A.G. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16, 839-842. Se obtuvieron alrededor de 500 transformantes en total.

Ejemplo 8 Transformación de *Trichoderma reesei* RUT-C30 con el vector de expresión de β -glucosidasa pAZ301

65 El vector de expresión pAZ301 se introdujo en *Trichoderma reesei* RUT-C30 por transformación mediada por

Agrobacterium tumefaciens AGL1. El método específico hace referencia a de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P.J., Beijersbergen, A.G. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16, 839-842. Se obtuvieron alrededor de 200 transformantes en total.

5 Ejemplo 9 Cribado de *Trichoderma reesei* transformantes de pAZ189 y detección de actividad enzimática

El cribado primario de los transformantes obtenidos en el ejemplo 6 se realizó en placas de cribado para determinar la resistencia a higromicina, y la composición del medio es la siguiente (g/l):

10 Fosfato de dipotasio (K_2HPO_4) 2,05 g/l; dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) 1,45 g/l; cloruro de sodio (NaCl) 0,15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0,5 g/l; cloruro de calcio hexahidratado ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$) 0,1 g/l; sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0,0025 g/l; sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) 0,5 g/l; glucosa 2 g/l; Higromicina 10 mg/l.

15 Para la cribado de transformantes resistentes a higromicina, el método particular hace referencia a de Groot, M.J. et al., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 1998(16): 839-842.

20 Después del cribado primario, las esporas se recogieron de los transformantes para la fermentación para determinar la producción de enzimas (en referencia a la solicitud de Patente China CN200980107269 ("Over-expression of catalase in *Trichoderma*") for the fermentation conditions for the *T. reesei* transformants). Las placas de esporas de nueve transformantes se tomaron al azar y se lavaron con 3 ml de TWEEN® 80 al 0,01 %. En particular, se cogieron varios transformantes después del cribado primario; cada transformante se inoculó individualmente en medio de selección con higromicina y se cultivó a 30 °C durante 5-7 días. Después, las placas se lavaron con solución salina normal al 0,8 % y las esporas se recogieron en la suspensión. Las esporas se inocularon en 50 ml de medio inductor de celulasa en matraces de agitación de vidrio de 250 ml. La composición del medio es la siguiente:

25 $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l; Tampón MES 19,52 g/l; extracto de levadura (Yeast Extract, OXOID, N.º de Cat. LP0021) 9 g/l; KH_2PO_4 4,5 g/l; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,32 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l; antiespumante (adquirido en Nanjing Huaxing Defoamers Co.; N.º de Cat. xp-m-130) 5 ml/l; 400x oligoelementos 2,5 ml/l pH 5,5; lactosa (esterilizada por separado) 40 g/l, en donde, las soluciones de 400 x oligoelementos son: ácido cítrico (anhidro) 175 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 g/l; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 16/l; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 3,2 g/l; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1,4 g/l; H_3BO_3 0,8 g/l. El cultivo de transformantes se incubó a 30 °C con agitación a una velocidad constante de 200 rpm. Desde el inicio de la fermentación (día 0), se tomó 1 ml de cultivo de fermentación los días 2, 3, 4 y 6, se centrifugó a 12000 xg y se recogió el sobrenadante.

35 El sobrenadante del transformante se midió para determinar la actividad β -glucosidasa. Ensayo de actividad enzimática: La actividad β -glucosidasa se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito por Venturi, et al. (Extracellular β -D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties, *J. Basic Microbiol.* 2002(42): 55-66).

40 Una unidad de actividad enzimática de la glucosidasa se define como la cantidad de enzima que produce p-nitrofenol 1,0 μ M por minuto a partir del sustrato de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 4 mM en citrato de sodio 100 mM con TWEEN® 20 al 0,01 % en las condiciones de 50 °C y pH 5.

45 Los resultados muestran que, la actividad enzimática de la β -glucosidasa de todos los transformantes es comparable a la de *Trichoderma reesei* Rut-C30 a lo largo de toda la fermentación. La Fig. 4 ilustra a modo de ejemplo la actividad enzimática de los transformantes B1 a B6 y las actividades enzimáticas de los transformantes restantes son similares a las de los transformantes B1 a B6 (resultados no mostrados).

Ejemplo 10 Cribado de *Trichoderma reesei* transformantes de pAZ193 y detección de actividad enzimática

50 El cribado primario de los transformantes obtenidos en el Ejemplo 7 se realizó en placas de cribado para determinar la resistencia a higromicina. El método particular hace referencia a de Groot, M.J. et al., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 1998(16): 839-842.

55 Después del cribado primario, las esporas se recogieron de los transformantes para la fermentación para determinar la producción de enzimas (en referencia a la solicitud de Patente China CN200980107269 ("Over-expression of catalase in *Trichoderma*") for the fermentation conditions for the *T. reesei* transformants). Las placas de esporas de nueve transformantes se tomaron al azar y se lavaron con 3 ml de TWEEN® 80 al 0,01 %. En particular, se cogieron varios transformantes después del cribado primario; cada transformante se inoculó individualmente en medio de selección resistente a higromicina y se cultivó a 30 °C durante 5-7 días. Después, las placas se lavaron con solución salina normal al 0,8 % y las esporas se recogieron en la suspensión. Las esporas se inocularon en 50 ml de medio inductor de celulasa en matraces de agitación de vidrio de 250 ml. La composición del medio es la siguiente:

60 $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l; Tampón MES 19,52 g/l; extracto de levadura (OXOID, N.º de Cat. LP0021) 9 g/l; KH_2PO_4 4,5 g/l; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,32 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l; antiespumante (adquirido en Nanjing Huaxing Defoamers Co.; N.º de Cat. xp-m-130) 5 ml/l; 400 x oligoelementos 2,5 ml/l pH 5,5; lactosa (esterilizada por separado) 40 g/l, en donde, las soluciones de 400 x oligoelementos son: ácido cítrico (anhidro) 175 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 g/l; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 16 g/l; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 3,2 g/l; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1,4 g/l; H_3BO_3 0,8 g/l.

El cultivo de transformantes se incubó a 30 °C con agitación a una velocidad constante de 200 rpm. Desde el día siguiente al inicio de la fermentación, se tomó 1 ml de cultivo de fermentación los días 2, 3, 4 y 6, se centrifugó a 12000 xg y se recogió el sobrenadante.

5 El cultivo del transformante se midió para determinar la actividad β -glucosidasa. Los resultados muestran que, el *Trichoderma reesei* BGL1 transformante de pAZ193 produce enzimas antes y la actividad enzimática está potenciada, en donde la actividad enzimática del transformante FB2 está significativamente potenciada. La figura 4 muestra a modo de ejemplo la actividad enzimática del transformante numerado FB2, en donde la actividad β -glucosidasa del transformante FB2 alcanza diez veces la de *T. reesei* Rut -C30 en el día 2 y día 3, y es significativamente más alta que la del transformante pAZ189 *T. reesei* BGL1. Por ejemplo, para B1 a B6 en la Fig. 4: PB2: 989,5U/ml; *T. reesei* BGL1 transformante de pAZ189: 31,2-79,6U/ml; *T. reesei* Rut-C30 97,21U/ml; lo anterior son la actividad enzimática del día 3. La actividad enzimática de los otros transformantes de pAZ193 también logró los efectos similares a FB2 (resultado no mostrado).

15 **Ejemplo 11 Cribado de *Trichoderma reesei* transformantes de pAZ301 y detección de actividad enzimática**

La transformación produjo alrededor de 300 transformantes en total. Después del cribado primario, las esporas se recogieron de los transformantes para la fermentación para determinar la producción de enzimas (en referencia a la solicitud de Patente China CN200980107269 ("*Over-expression of catalase in Trichoderma*") for the fermentation conditions for the *T. reesei* transformants). Las placas de esporas de nueve transformantes se tomaron al azar y se lavaron con 3 ml de TWEEN® 80 al 0,01 %. En particular, se cogieron varios transformantes después del cribado primario; cada transformante se inoculó individualmente en medio de selección resistente a higromicina y se cultivó a 30 °C durante 5-7 días. Después, las placas se lavaron con solución salina normal al 0,8 % y las esporas se recogieron en la suspensión. Las esporas se inocularon en 50 ml de medio inductor de celulasa en matraz de agitación de vidrio de 250 ml. La composición del medio es la siguiente:

20 (NH₄)₂SO₄ 5 g/l; Tampón MES 19,52 g/l; extracto de levadura (OXOID, N.º de Cat. LP0021) 9 g/l; KH₂PO₄ 4,5 g/l; CaCl₂.2H₂O 1,32 g/l; MgSO₄.7H₂O 1 g/l; antiespumante (adquirido de Nanjing Huaxing Defoamers Co., N.º de Cat. xp-m-130) 5 ml/l; 400x oligoelementos 2,5 ml/l pH 5,5; lactosa (esterilizada por separado) 40 g/l, en donde, las soluciones de 400 x oligoelementos son: ácido cítrico (anhidro) 175 g/l; FeSO₄.7H₂O 200 g/l; ZnSO₄.7H₂O 16 g/l; CuSO₄.5H₂O 3,2 g/l; MnSO₄.4H₂O 1,4 g/l; H₃BO₃ 0,8 g/l.

35 El cultivo de transformantes se incubó a 30 °C con agitación a una velocidad constante de 200 rpm. Se tomó 1 ml de cultivo de fermentación los días 2 y 3 de la fermentación, se centrifugó a 12000 xg y se recogieron sus sobrenadantes.

El cultivo del transformante se midió para determinar la actividad β -glucosidasa. Los resultados muestran que, el *T. reesei* BGL1 transformante de pAZ193 produce enzimas antes y la actividad enzimática está potenciada, en donde la actividad β -glucosidasa del transformante numerado PB2 alcanza cinco veces la de *T. reesei* Rut-C30 en el día 2 y día 3 y es significativamente más alta que la de *T. reesei* BGL1 transformante de pAZ189. Véase la Fig. 5: PB2: 482U/ml; transformante *T. reesei* BGL1 de pAZ189: 8,3-28,4U/ml; *T. reesei* Rut-C30 96,35 U/ml; los datos anteriores son la actividad enzimática del Día 2. Los otros transformantes de pAZ301 también logran efectos similares a los de PB2 (resultado no mostrado).

45 De los Ejemplos anteriores se ve que, para el transformante obtenido por la transformación de *T. reesei* RUT-C30 con el vector de expresión de BGL1 con proteasa aspártica (como F1 o p6281) como fragmento de fusión, su actividad β -glucosidasa alcanza varias veces más que la de *T. reesei* Rut-C30 en el Día 2 o 3 de la fermentación, y es significativamente más alta que *T. reesei* BGL1 transformante de pAZ189. Esto demuestra que el transformante que tiene β -glucosidasa fusionada con proteasas aspárticas (como F1 o P6281) muestra una actividad enzimática que es varias veces más alta que la del transformante sin fragmento de fusión, y el tiempo para alcanzar el pico de producción de enzima se acorta de 6 -7 días a 2-3 días en términos de período de fermentación.

50 Debería comprenderse que, después de leer las enseñanzas anteriores de la presente invención, los expertos en la materia pueden hacer diversos cambios o modificaciones y estas formas equivalentes nuevamente entran dentro del alcance como se define por las reivindicaciones adjuntas.

55 <110> Wilmar (Shanghai) Biotechnology Research & Development Center Co.,Ltd

<120> UN MÉTODO PARA LA EXPRESIÓN RECOMBINANTE DEL GEN BGL1 DE LA beta-GLUCOSIDASA

60 <130> 143455

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

65 <210> 1

ES 2 805 092 T3

<211> 1483
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5 <400> 1

```

gtcggtaatc cgcgtgtata gtaatacgag tgcgatctaa atactccgaa gctgctgcga      60
acccggagaa tcgagatgtg ctggaaagct tctagcgagc ggctaaatta gcatgaaagg      120
ctatgagaaa ttctggagac ggcttggtga atcatggcgt tccattcttc gacaagcaaa      180
gcgttccgct gcagtagcag gcactcattc ccgaaaaaac tcggagattc ctaagttagc      240
atggaaccgg aataatataa taggcaatac attgagttgc ctcgacgggt gcaatgcagg      300
ggtactgagc ttggacataa ctgttccgta cccacacct tctcaacct ttggcgtttcc      360
ctgattcagc gtaccogtac aagtcgtaat cactattaac ccagactgac cggacgtggt      420
ttgcccttca tttggagaaa taatgtcatt gcgatgtgta atttgcctgc ttgaccgact      480
ggggctgttc gaagccgaa tgtaggattg ttatccgaac tctgctcgt gaggcatggt      540
gtgaatctgt tcggggcagg acacgcctcg aaggttcacg gcaagggaaa ccaccgatag      600
cagtgcttag tagcaacctg taaagccgca atgcagcatc actggaaaat acaaaccaat      660
ggctaaaagt acataagtta atgcctaaag gaggcatata ccagcggcta ataattgtac      720
aatcaagtgg ctaaacgtac cgtaatttgc caacggcttg tggggttgca gaagcaacgg      780
caaagcccca cttccccacg tttgtttctt cactcagtc aatctcagct ggtgatcccc      840
caattgggtc gcttgtttgt tccgggtgaag tgaaagaaga cagaggtaag aatgtctgac      900
tcggagcgtt ttgcatacaa ccaagggcag tgatggaaga cagtgaaatg ttgacattca      960
aggagtattt agccagggat gcttgagtg atcgtgtaag gaggtttgtc tgccgatagc     1020
acgaatactg tatagtcact tctgatgaag tggtcacat tgaaatgtaa gtcggcactg     1080
aacaggcaaa agattgagtt gaaactgcct aagatctcgg gccctcgggc cttcggcctt     1140
tgggtgtaca tgtttgtgct ccgggcaaat gcaaagtgtg gtaggatcga acacactgct     1200
gcctttacca agcagctgag ggtatgtgat aggcaaatgt tcaggggcca ctgcatggtt     1260
tcgaatagaa agagaagctt agccaagaac aatagccgat aaagatagcc tcattaaacg     1320
gaatgagcta gtaggcaaag tcagcgaatg tgtatatata aaggttcgag gtccgtgcct     1380
ccctcatgct ctccccatct actcatcaac tcagatcctc caggagactt gtacaccatc     1440
ttttgaggca cagaaacca atagtcaacc gcggactggc atc                          1483
    
```

10 <210> 2
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <400> 2
 atgtatcgga agttggccgt catctcgcc ttctggcca cagctcgtc t 51t

20 <210> 3
 <211> 1220
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<400> 3

```

atgctcttct cttctattgc cattggtgag gcagcaactg ctgccttggc atcgccggta      60
aagccaagtg ccaagactgc cgcgctatca gtgaagcgtg tctcgaacgt caaatcattg      120
aagaatattg tccaaaaggg ccaagcacgc atcaacaaga tcaatggcgt caaggacatc      180
    
```

25

ES 2 805 092 T3

gagggcagag	ctagcgcccc	agttaccaac	gaggatgta	gctatggtgc	ctcagtcact	240
atcggtggtc	aatcttggga	cctcatcgtc	gacactggat	gtacgtcatc	actacataga	300
caactgaacaa	cgcatgtgct	gacctgatat	cctaactagc	ttcaaacacg	tggtgtggtg	360
cccaacgctc	atgcgagcct	tcatctactg	gcaagtccac	ggcggttcc	gtccaggtta	420
gctatggttc	cggctccttc	tccggcaccg	agtacaagga	cacagttagc	ttcggtggtt	480
tgactgtcac	atcacagtcg	gttggagctg	cccgttcac	ctctggcttt	tcaggtgtcg	540
atggaattat	tggtcttggg	ccggtggatc	tcactgagga	caccgtctcc	aacgccaaca	600
cggttccaac	cttcctggat	aatctctaca	gccaaggttc	catctcgact	gaggtgctgg	660
gtgtttcctt	caagccagag	tctggcagtg	acagcgatga	caccaacggc	gagttgaccc	720
tcgggcgtac	tgatagctcc	aagtacacgg	gctctctcac	ctacttctca	actctcaaga	780
gtggctctgc	tgctccctac	tggggcatct	ctattgtag	ttcacctac	ggctcgacga	840
ccctcgcatc	gtctgcgacc	ggcattgtcg	acactggtag	tacgctcatc	tacatcccca	900
ccaaggctta	caatgcattc	ctgtctgccg	ctggtggcaa	gactgacagc	tcttctggcc	960
tgcgctctt	ctcaaaagcg	ccaacatcca	actttgctat	caagtttggc	tcaacgacct	1020
acaccctcac	accttctcaa	tacttggttc	ccaccgctca	gtacagcttc	tacggactca	1080
gctctggaaa	gtactacgct	tggattaacg	acggtggcag	ctcgggtgtg	aacaccatta	1140
ttggtcagaa	gttctctgaa	aactactact	ccgtttttga	tactaccaac	ggccgcatcg	1200
gctttgctac	cgcggcttaa					1220

<210> 4

<211> 48

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<400> 4

ggatcccag ccactaccac tgaagctct cccggaccta ccacgcgt 48

10 <210> 5

<211> 2206

<212> ADN

<213> Trichoderma reesei

15 <400> 5

gttgtacctc	ctgcagggac	tccatgggga	accgcgtacg	acaaggcgaa	ggccgcattg	60
gcaaagctca	atctccaaga	taaggtcggc	atcgtgagcg	gtgtcggctg	gaacggcggg	120
ccttgcggtg	gaaacacatc	tccggcctcc	aagatcacgt	atccatcgct	atgccttcaa	180
gacggacccc	tccggttctg	atactcgaca	ggcagcagag	cctttacgcc	ggcggttcaa	240
gcggcctcga	cgtgggatgt	caatctgatc	cgcgaacgtg	gacagttcat	cggtgaggag	300
gtgaaggcct	cggggattca	tgtcatactt	ggtcctgtgg	ctgggcccgt	gggaaagact	360
ccgcagggcg	gtcgcaactg	ggagggcttc	ggtgtcgatc	catatctcac	gggcattgcc	420
atgggtcaaa	ccatcaacgg	catccagtcg	gtaggcgtgc	aggcgacagc	gaagcactat	480
atcctcaacg	agcaggagct	caatcgagaa	accatttctg	gcaaccaga	tgaccgaact	540
ctccatgagc	tgtatacttg	gccatttggc	gacgcgggtc	aggccaatgt	cgcttctgtc	600
atgtgctcgt	acaacaaggt	caataccacc	tgggcctgcg	aggatcagta	cacgctgcag	660
actgtgctga	aagaccagct	ggggttccca	ggctatgtca	tgacggactg	gaacgcacag	720
cacacgactg	tccaaagcgc	gaattctggg	cttgacatgt	caatgcctgg	cacagacttc	780
aacggtaaca	atcggctctg	gggtccagct	ctcaccaatg	cggtaaatag	caatcaggtc	840
cccacgagca	gagtcgacga	tatggtgact	cgtatcctcg	ccgcatggta	cttgacaggc	900
caggaccagg	caggctatcc	gtcgttcaac	atcagcagaa	atggtcaagg	aaaccacaag	960
accaatgtca	gggcaattgc	cagggacggc	atcgttctgc	tcaagaatga	cgccaacatc	1020
ctgccgctca	agaagcccgc	tagcattgcc	gtcgttggat	ctgccgcaat	cattggtaac	1080
cacgccagaa	actcgccttc	gtgcaacgac	aaaggctgcg	acgacggggc	cttgggcatg	1140
ggttgggggt	ccggcgccgt	caactatccg	tacttcgtcg	cgccctacga	tgccatcaat	1200
accagagcgt	cttcgcaggg	caccaggtt	accttgagca	acaccgaaa	cacgtcctca	1260
ggcgcactct	cagcaagagg	aaaggacgtc	gccatcgtct	tcatcaccgc	cgactcgggt	1320
gaaggctaca	tcaccgtgga	gggcaacgcg	ggcgatcgca	acaacctgga	tccgtggcac	1380
aacggcaatg	ccctggtcca	ggcggtgggc	ggtgccaaca	gcaacgtcat	tggtgtgtc	1440
cactccgttg	gcgccatcat	tctggagcag	attcttctgc	ttccgcaggt	caaggccgtt	1500
gtctgggctg	gtcttctctc	tccagagagc	ggcaatgcgc	tctgtcagct	gctgtgggga	1560
gatgtcagcc	cttctggcaa	gctggtgtac	accattgcga	agagcccca	tgactataac	1620
actcgcatcg	tttccggcgg	cagtgcacgc	ttcagcgagg	gactgttcat	cgactataag	1680

ES 2 805 092 T3

cacttcgacg acgccaatat cacgcccggg tacgagttcg gctatggact gtgtaagttt 1740
 gctaacctga acaatctatt agacagggtg actgacggat gactgtggaa tgatagctta 1800
 caccaagttc aactactcac gcctctccgt cttgtcgacc gccaaagtctg gtcctgcgac 1860
 tggggccggt gtgccgggag gcccgagtga tctgttccag aatgtcgcga cagtcaccgt 1920
 tgacatcgca aactctggcc aagtgactgg tgcccaggta gccagctgt acatcaccta 1980
 cccatcttca gcaccagga cccctccgaa gcagctgcga ggctttgcca agctgaacct 2040
 cacgcctggt cagagcggaa cagcaacgtt caacatccga cgacgagatc tcagctactg 2100
 ggacacggct tcgcagaaat ggggtggtgcc gtcggggtcg tttggcatca gcgtgggagc 2160
 gagcagccgg gatatcaggc tgacgagcac tctgtcggta gcgtaa 2206

5 <210> 6
 <211> 338
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 6

agctccgtgg cgaaagcctg acgcaccggt agattcttgg tgagcccgta tcatgacggc 60
 ggccgggagct acatggcccc ggggtgattta ttttttttgt atctacttct gacccttttc 120
 aaatatacgg tcaactcatc tttcactgga gatgcggcct gcttgggtatt gcgatgttgt 180
 cagcttgcca aattgtggct ttcgaaaaca caaacgatt ccttagtagc catgcatttt 240
 aagataacgg aatagaagaa agaggaaatt aaaaaaaaaa aaaaaacaaa catcccgttc 300
 ataaccgta gaatcgccgc tcttcgtgta tcccagta 338

10 <210> 7
 <211> 1161
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 7

atgctcttct cctctattgc cattgttgcg gccggcaactg ctgccttggc atcgccggta 60
 aagccaagt ccaagactgc cgcgctatca gtgaagcgtg tctcgaacgt caaatcattg 120
 agaatattg tccaaaaggg ccaggcacgc atcaacaaga tcaacggcgt caaagacatc 180
 gaggccagag ctagcggccc agccaccaac gaggatgta gctatggtgc ctcggtcact 240
 attggtggta aatcctggga cctcatcgtc gacactggat cttcaaacac gtggtgtggt 300
 gctcaaagct catgcgagcc ttcactact ggcaagtcca cgggcgggtc cgtccaggtc 360
 agctatggtt ccggtcctt ctccggcacc gagtacaagg acacagttag cttcgggtgt 420
 ttgactgtca catcacagtc ggttggagct gcccgttcat cctctggctt ttcaggtgtc 480
 gatggaatta ttggctttgg tccggtggat ctactgagg acaccgtctc caacgccaac 540
 acggttccaa ccttcttggg taatctctac agccaagggt ccatctcgac tgaggtgctg 600
 ggcgtttctt tcaagccaga gtctggcagt gacagtgatg acaccaacgg cgagttgacc 660
 ctcgccggta ctgatagctc caagtacacg ggctctctca cctacttctc aactctcaag 720
 agtggctctg ctgctcccta ctggggcatc tctattgcta gtttcacctt cggctcgacg 780
 accctcgcat cgtctgcgac cggcattgtc gacactggta ctacgctcat ctacatcccc 840
 accaaggctt acaatgcatt cctgtctgcc gctggtggca agactgacag ctcttctggc 900
 ctcgccgtct tctcaaaagc gccaacatcc aactttgcta tcaagtttgg ctcaacgacc 960
 tacaccctca caccttctca atacttgggt cccacctctc agtacagctt ctacggactc 1020
 agcttggaag agtactacgc ttggattaac gacggtggca gctcgggtgt caacaccatt 1080
 attggccaga agttcctgga aaactactac tccgtttttg atactacaa cggcccgcatc 1140
 ggctttgcta ccgccgctta a 1161

20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión, en donde dicha proteína de fusión comprende:

- 5 (a) una proteasa aspártica o un fragmento soluble de la misma, en donde dicho fragmento soluble tiene la actividad proteolítica de la proteasa aspártica;
 (b) una β -glucosidasa o un fragmento activo de la misma que tiene al menos un 50 % de la actividad β -glucosidasa de dicha β -glucosidasa; y
 10 (c) opcionalmente, una secuencia enlazadora situada entre (a) y (b), que está codificada preferentemente por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4.

2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha proteasa aspártica o dicho fragmento soluble de la misma son de un microorganismo degradador de celulosa seleccionado del grupo que consiste en *Trichoderma*, preferentemente *T. harzianum* y *T. reesei*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Botrytis*, *Cellulomonas*,
 15 *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* y/o *Butyrivibrio fibrisolvens*; preferentemente, dicha proteasa aspártica o dicho fragmento soluble de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 3 o 7 o por una secuencia que tiene una identidad del 85 % o más con la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 3 o 7, según se determina por BLAST o una secuencia de aminoácidos codificada por las SEQ ID NO: 3 o 7 y que tiene sustitución, delección o adición de 1-
 20 10 aminoácidos, preferentemente la sustitución conservativa de 1-10 aminoácidos.

3. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha β -glucosidasa o dicho fragmento activo de la misma son de un microorganismo degradador de celulosa seleccionado del grupo que consiste en *Trichoderma*, preferentemente *T. harzianum* y *T. reesei*, *Penicillium*, *Aspergillus*, preferentemente *A. niger*, *Mucor*,
 25 *Botrytis*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, y/o *Butyrivibrio fibrisolvens*; preferentemente, dicha β -glucosidasa o dicho fragmento activo de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 5 y que tiene sustitución, delección o adición de 1-10 aminoácidos, preferentemente la sustitución conservativa de 1-10 aminoácidos; preferentemente, dicha β -glucosidasa o dicho
 30 fragmento activo están codificados por el gen Bgl1, más preferentemente por el gen Bgl1 de β -glucosidasa de *T. reesei*, preferentemente, que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5.

4. Una secuencia codificante que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

35 5. Un vector de expresión recombinante que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y que comprende:

- (a) una secuencia codificante de una proteasa aspártica o un fragmento soluble de la misma, en donde dicho fragmento soluble tiene la actividad proteolítica de la proteasa aspártica;
 40 (b) una secuencia codificante de β -glucosidasa o un fragmento activo de la misma que tiene al menos un 50 % de la actividad β -glucosidasa de dicha β -glucosidasa;
 y
 (c) opcionalmente, una secuencia codificante de una secuencia enlazadora situada entre (a) y (b), que es preferentemente la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4.
 45

6. El vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el vector de expresión recombinante comprende además uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en:

- (i) un promotor;
 50 (ii) una secuencia codificante de péptido señal;
 (iii) una secuencia codificante de péptido líder;
 (iv) un terminador;
 (v) un gen marcador; y
 55 (vi) una secuencia de poliadenilación.

7. El vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** el esqueleto básico del vector de expresión recombinante es el esqueleto básico del plásmido pCambia1300, plásmido pCambia2300, plásmido pCambia1301 o plásmido pBIN19; preferentemente, el vector de expresión recombinante es pAZ193.

60 8. El vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** la secuencia codificante de dicha proteasa aspártica o dicho fragmento soluble de la misma es del grupo que consiste en: *Trichoderma*, preferentemente *T. harzianum*, *T. reesei*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Botrytis*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* y/o *Butyrivibrio fibrisolvens*; preferentemente, dicha proteasa aspártica o dicho fragmento soluble de la misma comprenden la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 3 o 7 o por una secuencia que tiene una
 65 identidad del 85 % o más con la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 3 o 7, según se determina por BLAST

o una secuencia de aminoácidos codificada por las SEQ ID NO: 3 o 7 y que tiene sustitución, delección o adición de 1-10 aminoácidos, preferentemente la sustitución conservativa de 1-10 aminoácidos.

- 5 9. El vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** la secuencia codificante de dicha β -glucosidasa o dicho fragmento activo de la misma se selecciona del grupo que consiste en: *Trichoderma*, preferentemente *T. harzianum*, *T. reesei*, *Penicillium*, *Aspergillus*, preferentemente *A. niger*, *Mucor*, *Botrytis*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus* y/o *Butyrivibrio fibrisolvens*; preferentemente, dicha β -glucosidasa o dicho fragmento activo de la misma comprenden la
- 10 secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 5 y que tiene sustitución, delección o adición de 1-10 aminoácidos, preferentemente la sustitución conservativa de 1-10 aminoácidos; preferentemente, la secuencia codificante de dicha β -glucosidasa o dicho fragmento activo de la misma es el gen Bgl1, más preferentemente el gen es el gen Bgl1 de β -glucosidasa de *T. reesei*, preferentemente, que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5.
- 15 10. Una célula hospedadora recombinante que comprende la secuencia codificante de acuerdo con la reivindicación 4 o el vector de expresión recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, preferentemente en donde la célula hospedadora es *E. coli*, o levadura, preferentemente, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* *Agrobacterium*, preferentemente *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*.
- 20 11. Un microorganismo degradador de celulosa recombinante, **caracterizado porque** dicho microorganismo degradador de celulosa recombinante o dicha célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 10 se transforman con el vector de expresión recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, expresando, de este modo, la secuencia codificante de dicha proteasa aspártica o dicho fragmento soluble de la misma y de dicha β -glucosidasa o dicho fragmento activo de la misma.
- 25 12. El microorganismo degradador de celulosa recombinante de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** dicho microorganismo degradador de celulosa se selecciona de *Trichoderma*, preferentemente *T. harzianum*, *T. reesei* o *Aspergillus*, preferentemente *A. niger* o *Penicillium*, y más preferentemente, el microorganismo degradador de celulosa es *T. reesei* ATCC56765.
- 30 13. El microorganismo degradador de celulosa recombinante de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** la actividad β -glucosidasa del microorganismo degradador de celulosa recombinante es de 2 a 20 veces, preferentemente 3 a 10 veces mayor que la del microorganismo degradador de celulosa no codificante para la proteína de fusión de las reivindicaciones 1-3; y/o, el período de fermentación degradadora de celulosa del microorganismo
- 35 degradador de celulosa recombinante es más corto que el del microorganismo degradador de celulosa no codificante para la proteína de fusión de las reivindicaciones 1-3, preferentemente tan solo de 1 a 3 días.
- 40 14. Un método para preparar el microorganismo degradador de celulosa recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, el método comprende las etapas de:
- (i) proporcionar el vector de expresión recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 o la célula hospedadora recombinante de acuerdo con la reivindicación 10; y
- (ii) transformar un microorganismo degradador de celulosa con el vector de expresión recombinante o el
- 45 hospedador recombinante en condiciones adecuadas para la transformación, para obtener el microorganismo degradador de celulosa recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13.
- 50 15. Un método para degradar un material celulósico o celobiosa, comprendiendo el método poner en contacto una cantidad eficaz de la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o una cantidad eficaz del microorganismo degradador de celulosa recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13 con el material celulósico o celobiosa en las condiciones adecuadas para la degradación del material celulósico o celobiosa.

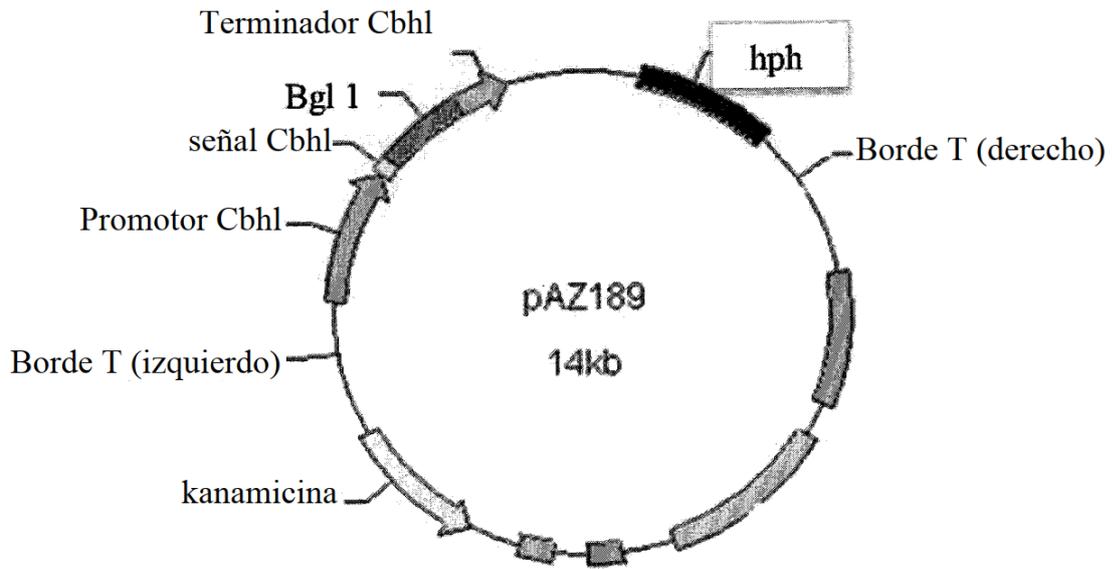


Fig. 1

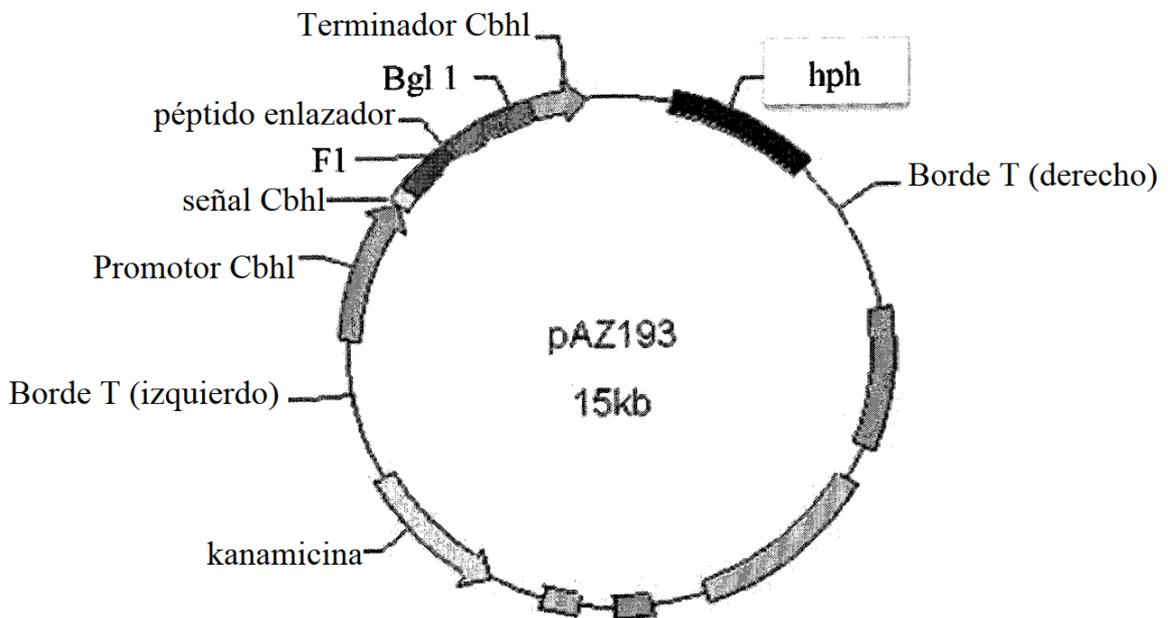


Fig. 2

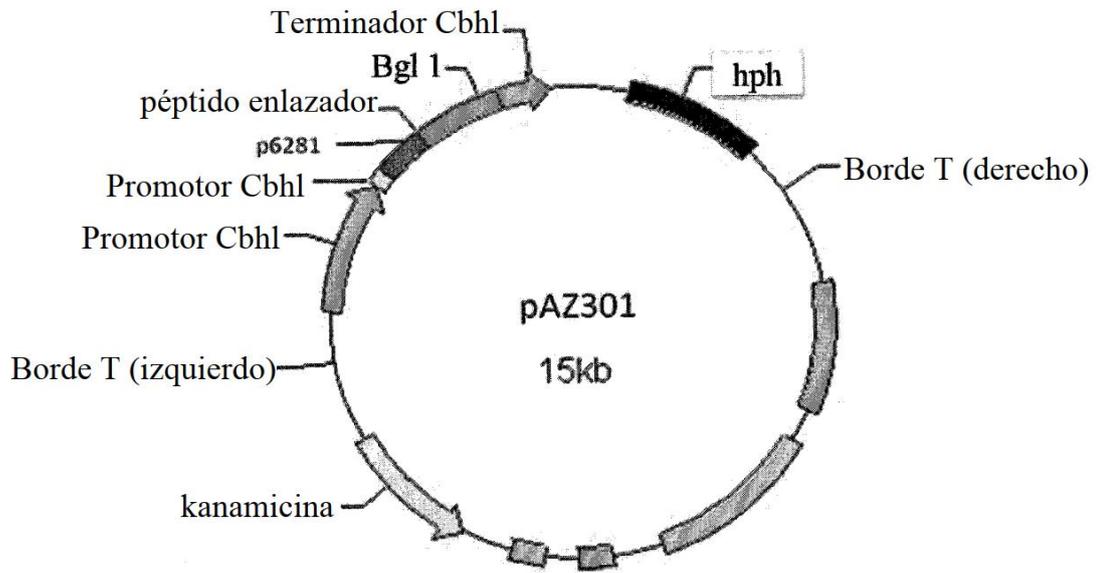


Fig. 3

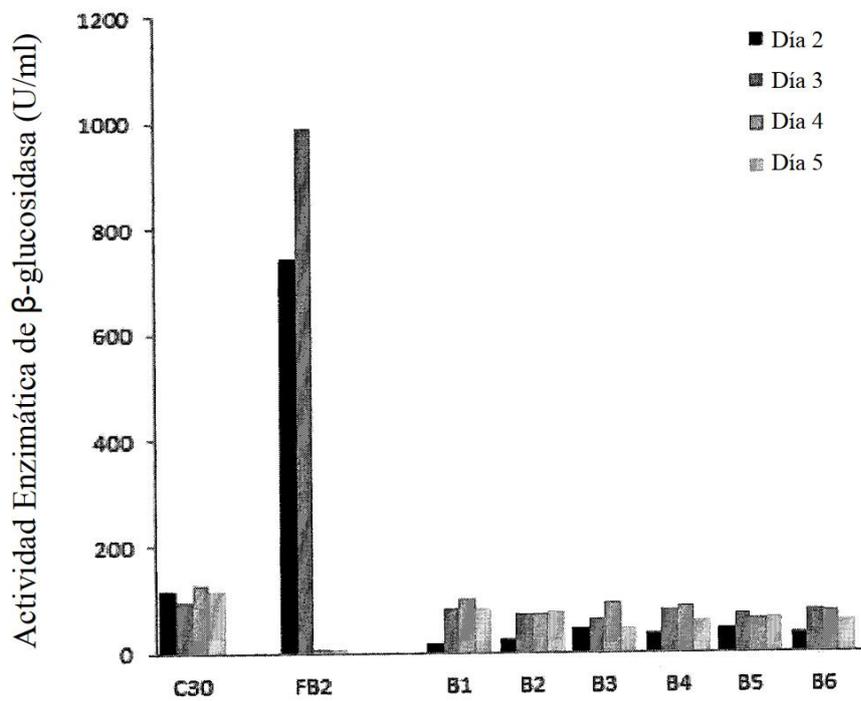


Fig. 4

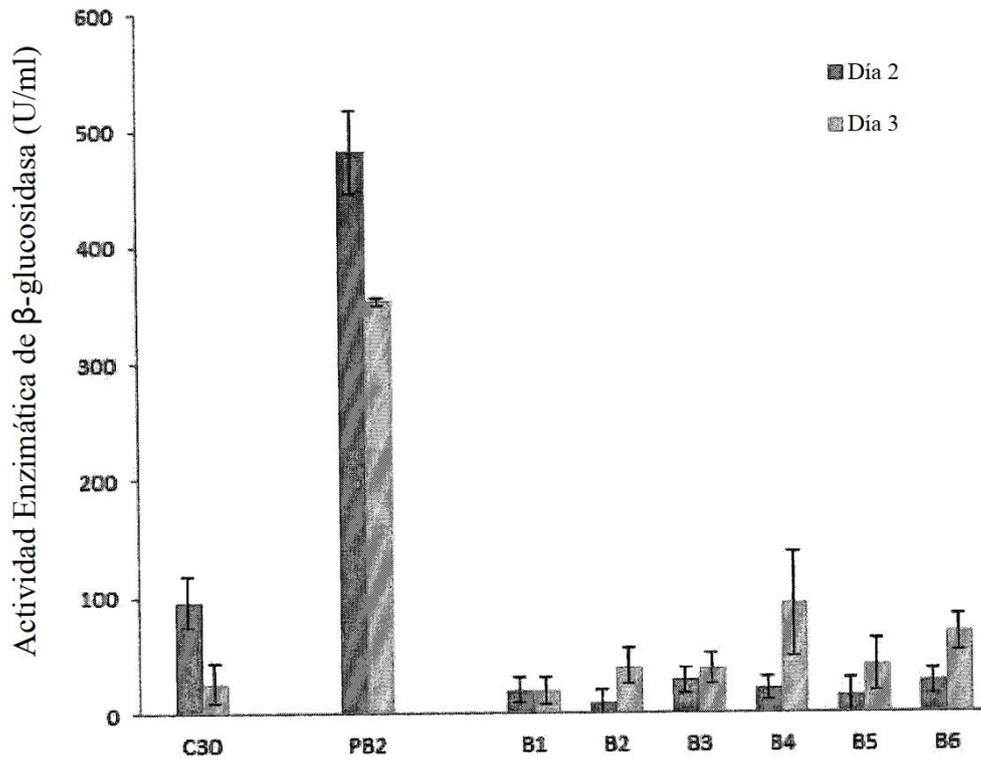


Fig. 5