

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 512 567**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2008 E 08768332 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2160471**

54 Título: **Selección de cepas fúngicas útiles**

30 Prioridad:

15.06.2007 US 934677 P

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

24.10.2014

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 PAGE MILL ROAD
PALO ALTO, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**BODIE, ELIZABETH A. y
LARENAS, EDMUND A.**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 512 567 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

Selección de cepas fúngicas útiles

3. INTRODUCCIÓN

5 [0001] Los hongos filamentosos son productores eficaces de enzimas de celulasa y se han explotado por su capacidad para producir estas enzimas. Las celulasas son valiosas comercialmente en las industrias textiles, de detergente y de papel, y cada vez más para la producción de biocombustibles, que requiere la hidrólisis de materia vegetal a azúcares fermentables. Se encuentran tres tipos mayoritarios de actividades enzimáticas: exoglucanasas o exocelobiohidrolasas, endoglucanasas y β -glucosidasas. Estos tres tipos diferentes de enzimas de celulasa actúan de forma sinérgica para convertir celulosa en glucosa.

10 [0002] Schimenti *et. al.* (*Mycologia*, vol.75, núm.5, pp. 876-880, 1983) describe la selección de mutantes hipercelulolíticos de *Trichoderma reesei* basada en la resistencia a la nistatina.

[0003] Kuek *et. al.* (*Biotechnology Letters* 1984, vol.6, núm.9, pp.561-566) describe la detección de hongos para una productividad de glucoamilasa mejorada utilizando cultivos de caldo de dextrano en tampón.

15 [0004] Montenecourt B S (*Trends in Biotechnology* 1983, vol.1, núm.5, pp.156-161) describe celulasas de *Trichoderma reesei*.

[0005] Es necesario identificar los hongos filamentosos deseados, especialmente hongos filamentosos con rendimiento y producción de proteína deseados, por ejemplo, elevado rendimiento y/o producción de enzimas de celulasa.

4. DESCRIPCIÓN

20 [0006] La presente información dada a conocer se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que se pueden combinar ciertos parámetros en el proceso de detección de hongos filamentosos deseados. Por consiguiente, la presente información dada a conocer proporciona métodos para la detección de un hongo filamentosos deseado basada en al menos dos parámetros, por ejemplo, parámetros asociados con el metabolismo y el uso de carbono, según se describe en las reivindicaciones adjuntas.

25 [0007] En algunos modos de realización, la presente información dada a conocer proporciona un método para la detección de un hongo filamentosos deseado. Específicamente, la presente invención proporciona un método, según se explica en la reivindicación 1, para la detección de un hongo filamentosos con mayor eficacia de utilización de carbono. Aquí, se analiza una población de hongos filamentosos de prueba (también denominados en el presente documento "hongos filamentosos en prueba") para la detección de una subpoblación de hongos filamentosos con un índice de metabolismo predeterminado. Un hongo filamentosos se selecciona de entre la subpoblación de hongos filamentosos basándose en un parámetro de selección predeterminado que indica la eficacia de utilización de carbono del hongo filamentosos en prueba. La descripción también proporciona un hongo filamentosos obtenido mediante este método de detección.

30

[0008] Aunque no de acuerdo con la invención según se reivindica, la presente información dada a conocer podría proporcionar también un método para la detección de un hongo filamentosos en el que se analiza una población de hongos filamentosos de prueba basándose en un primer parámetro de selección y un segundo parámetro de selección. El primer parámetro de selección indica el índice de metabolismo de un hongo filamentosos de prueba y el segundo parámetro de selección indica la capacidad de un hongo filamentosos en prueba para resistir a un antibiótico.

35

[0009] La presente información dada a conocer también proporciona un método para la detección de un hongo filamentosos en el que se preselecciona una población de hongos filamentosos de prueba frente a un antibiótico y se analiza basándose en un parámetro de selección predeterminado que indica el índice de metabolismo de un hongo filamentosos de prueba.

40

[0010] Estas y otras características de la presente información dada a conocer se describen a continuación.

45 **5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0011] El experto en la materia entenderá que los dibujos son sólo para fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente información dada a conocer.

La figura 1 muestra la mejora de producción de proteína en la cepa A83 en comparación con la cepa 41G.

50 La figura 2 muestra la ventaja de actividad específica de la cepa 41G en comparación con la cepa A83.

La figura 3 muestra la evolución de la cepa A83 y las mejoras en rendimiento (recuadro gris) y productividad (recuadro blanco).

La figura 4 muestra los resultados de 41G y A83 en un ensayo de sacarificación.

6. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE VARIOS MODOS DE REALIZACIÓN

- 5 **[0012]** La presente información dada a conocer se describirá en detalle a continuación a modo de referencia únicamente utilizando las siguientes definiciones y ejemplos. A menos que se defina de otra manera en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia al cual pertenece esta invención. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o modos de realización, que se pueden tomar haciendo referencia a la memoria en conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación están definidos más exhaustivamente haciendo referencia a la memoria en conjunto.
- 10
- [0013]** EL término “polipéptido”, según se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto formado por una sola cadena de residuos de aminoácidos unidos por enlaces péptidos. El término “proteína”, según se utiliza en el presente documento, se emplea indistintamente con el término “polipéptido”.
- 15
- [0014]** Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se emplean indistintamente e incluyen ADN, ARN, ADNc, monocatenario o bicatenario y modificaciones químicas de los mismos. Puesto que el código genético se degenera, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido concreto, y la presente descripción incluye todos los polinucleótidos, que codifican una secuencia de aminoácidos concreta.
- 20
- [0015]** Los términos “recuperado”, “aislado” y “separado” se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a una proteína, célula, ácido nucleico, aminoácido, etc. que se elimina de al menos un componente con el que está asociado de forma natural.
- [0016]** Según se utiliza en el presente documento, el término “gen” se refiere a un polinucleótido (p. ej., un segmento de ADN) que participa en la producción de una cadena de polipéptidos, que puede o no incluir las regiones anterior y posterior a la región de codificación, por ejemplo, la secuencia 5’ no traducida (5’-UTR) o secuencia “líder” y la secuencia 3’-UTR o secuencia “tráiler”, así como secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos de codificación individuales (exones).
- 25
- [0017]** Según se utiliza en el presente documento, el término “expresión” se refiere al proceso por el que se produce un polipéptido basado en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.
- 30
- [0018]** Según se utiliza en el presente documento, el término “expresión” se refiere al proceso por el que se produce un polipéptido basado en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.
- [0019]** El término “proteína segregada” se refiere a una región de un polipéptido que se libera de una célula durante la secreción de proteínas. En algunos modos de realización, la proteína segregada es la proteína que se libera o escinde de un polipéptido de fusión recombinante.
- 35
- [0020]** El término “secreción” se refiere al movimiento selectivo de una proteína a través de una membrana en una célula huésped al espacio extracelular y los medios circundantes.
- [0021]** Según se utiliza en el presente documento, los términos “producido” o “producción de”, especialmente en lo que se refiere a proteínas o enzimas, se refiere a la expresión y/o secreción de la proteína o enzima.
- 40
- [0022]** Según se utiliza en el presente documento, el término “cultivo” se refiere a hacer crecer una población de células bajo condiciones adecuadas en un medio líquido, semisólido o sólido.
- [0023]** Según se utiliza en el presente documento, “sustituido” y “modificado” se utilizan indistintamente y se refieren a una secuencia, como una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico, que incluye una delección, inserción, sustitución o interrupción de una secuencia de origen natural. A menudo, en el contexto de la invención, una secuencia sustituida se referirá, por ejemplo, a la sustitución de un residuo de origen natural.
- 45
- [0024]** Según se utiliza en el presente documento, “enzima modificada” se refiere a una enzima que incluye una delección, inserción, sustitución o interrupción de una secuencia de origen natural.
- [0025]** El término “variante” se refiere a una región de una proteína que contiene uno o más aminoácidos diferentes en comparación con una proteína de referencia, por ejemplo, una proteína de origen natural o salvaje.
- 50

[0026] Según se utiliza en el presente documento, el término “cepa parental” se refiere a la cepa de células fúngicas que existía antes de la exposición a un agente que genera diversidad genética. En algunos modos de realización, la cepa parental ya es una cepa muy productiva o posee características favorables o deseadas. Después de la exposición al agente, las “células parentales” se convierten en una población de células de prueba genéticamente diversas. Debido a la naturaleza aleatoria del proceso para generar diversidad genética, se espera que se generen muchos tipos diferentes de células. Por lo tanto, cuando se aplican las técnicas de selección, se ponen bajo selección un gran número de células de prueba diferentes.

[0027] El término “células de prueba” o “población de hongos filamentosos en prueba”, según se utiliza indistintamente en el presente documento, se refiere, en general, a células fúngicas genéticamente diversas generadas a partir de una cepa madre u hongo filamentosos. El término también incluye cualquier progenie de la célula de prueba.

[0028] Las “células mejoradas” se aíslan por sus características de crecimiento, nivel de producción de enzimas y/u otros criterios de selección como se determina en los ensayos descritos en el presente documento. El término también incluye cualquier progenie de la célula mejorada. La(s) célula(s) mejorada(s) se puede(n) aislar y propagar para establecer una nueva cepa fúngica mejorada. Ejemplos no limitativos de células mejoradas presentan las siguientes características: (i) una mayor eficacia de utilización de carbono en comparación con las células parentales; (ii) una actividad específica mejorada de una o más proteínas o enzimas producidas en comparación con las células parentales; (iii) un rendimiento total mejorado determinado, por ejemplo, midiendo gramo de proteína o enzima producida por gramo de entrada de carbono; (iv) un mayor nivel de producción de una o más proteínas o enzimas a temperatura normal; y/o (v) la capacidad de mantener un nivel de producción de proteína o enzima que es mejor que las células parentales a temperaturas elevadas.

[0029] Como ejemplo no limitativo, el intervalo de temperatura normal para la producción de celulasas mediante *Trichoderma-reesei* está comprendido entre 24°C y 28°C. De acuerdo con la presente información dada a conocer, la temperatura de selección para *Trichoderma-reesei* puede ser 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, o 48°C. En algunos modos de realización, el cultivo se lleva a cabo en fase líquida. Dependiendo del diseño experimental, se puede utilizar un intervalo de temperaturas de selección. La elección de las temperaturas de selección para el cultivo depende de otros factores, tales como, pero sin carácter limitativo, el índice de crecimiento, la viabilidad y la distribución de diferentes tipos de celulasas que producen las células de prueba y será determinable por un experto en la materia.

[0030] Los términos “celulasa” o “enzimas celulolíticas” se utilizan indistintamente y se refieren a una categoría de enzimas capaces de hidrolizar polímeros de celulosa (enlaces beta-1,4-glucano o beta D-glucosídicos) a oligómeros celooligosacáridos más cortos, celobiosa y/o glucosa. En general, la categoría de enzimas incluye, pero sin carácter limitativo: (i) endoglucanasas (EG) o 1,4-β-d-glucano-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), (ii) exoglucanasas, que incluyen 1,4-β-d-glucano glucanohidrolasas (también conocidas como celodextrinasas) (EC 3.2.1.74) y 1,4-β-d-glucano celobiohidrolasas (exo-celobiohidrolasas, CBH) (EC 3.2.1.91), y (iii) β-glucosidasas (BG) o β-glucosido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21).

[0031] El término “exocelobiohidrolasa” (CBH) se refiere a un grupo de enzimas de celulasa clasificadas como EC 3.2.1.91 y/o las de ciertas familias GH, que incluyen, pero sin carácter limitativo, las de las familias GH 5, 6, 7, 9 o 48. Estas enzimas también se conocen como exoglucanasas o celobiohidrolasas. Las enzimas CBH hidrolizan celobiosa a partir del extremo reductor o no reductor de celulosa. En general, una enzima tipo CBHI hidroliza preferentemente celobiosa a partir del extremo reductor de celulosa y una enzima tipo CBHII hidroliza preferentemente el extremo no reductor de celulosa.

[0032] El término “actividad de celobiohidrolasa” se define en el presente documento como una actividad de 1,4-D-glucano celobiohidrolasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, celotetrosa, o cualquier polímero que contenga glucosa enlazada en beta-1,4, liberando celobiosa de los extremos de la cadena. Según se utiliza en el presente documento, la actividad de celobiohidrolasa se determina mediante la liberación de azúcar de reducción hidrosoluble de la celulosa como se mide mediante el método PHBAH de Lever *et. al.*, 1972, *Anal. Biochem.* 47: 273-279. Se establece una distinción entre el modo de ataque de una celobiohidrolasa a una exoglucanasa y el modo de ataque a una endoglucanasa mediante una medición similar de liberación de azúcar de reducción de celulosa sustituida tal como carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa (Ghose, 1987, *Pure & Appl. Chem.* 59: 257-268). Una celobiohidrolasa verdadera tendrá un índice muy alto de actividad en celulosa no sustituida en comparación con celulosa sustituida (Bailey *et al.*, 1993, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 65-76).

[0033] El término “endoglucanasa” (EG) se refiere a un grupo de enzimas de celulasa clasificadas como EC 3.2.1.4, y/o las de ciertas familias GH, que incluyen, pero sin carácter limitativo, las de las familias GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 17, 31, 44, 45, 48, 51, 61, 64, 74 o 81. Una enzima EG hidroliza los enlaces internos beta-1,4 glucosídicos de la celulosa. El término “endoglucanasa” se define en el presente documento como una endo-1,4-(1,3;1,4)-

beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa que cataliza la endohidrolisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en celulosa, derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mixtos tales como beta-D glucanos de cereales o xiloglucanos, y otras materias vegetales que contienen componentes celulósicos. Según se utiliza en el presente documento, la actividad de endoglucanasa se determina utilizando la hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257-268.

[0034] El término "beta-glucosidasa" se define en el presente documento como una beta-D-glucósido glucohidrolasa clasificada como EC 3.2.1.21, y/o las de ciertas familias GH, que incluyen, pero sin carácter limitativo, las de las familias GH 1, 3, 9 o 48, que cataliza la hidrólisis de celobiosa con la liberación de beta-D-glucosa. Según se utiliza en el presente documento, la actividad de beta-glucosidasa se puede medir mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, HPLC. La "actividad celulolítica" incluye la actividad de exoglucanasa, la actividad de endoglucanasa o ambos tipos de actividad enzimática, así como la actividad de beta-glucosidasa.

[0035] El término "hongos filamentosos" indica todos y cada uno de los hongos filamentosos reconocidos por los expertos en la materia. En general, los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos e incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina. Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta de quitina, beta-glucano y otros polisacáridos compuestos. En algunos modos de realización, los hongos filamentosos de la presente información dada a conocer son morfológicamente, fisiológicamente y genéticamente distintos de las levaduras. En algunos modos de realización, los hongos filamentosos incluyen, pero sin carácter limitativo, los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Endothia*, *Endothia mucor*, *Fusarium*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichophyton*, y *Trametes pleurotus*. En algunos modos de realización, los hongos filamentosos incluyen, pero sin carácter limitativo, los siguientes: *A. nidulans*, *A. niger*, *A. awomari*, p.ej., NRRL 3112, ATCC 22342 (NRRL 3112), ATCC 44733, ATCC 14331 y cepa UVK 143f, *A. oryzae*, p.ej., ATCC 11490, *N. crassa*, *Trichoderma reesei*, p.ej., NRRL 15709, ATCC 13631, 56764, 56765, 56466, 56767, y *Trichoderma viride*, p.ej., ATCC 32098 y 32086.

[0036] El término "*Trichoderma*" o " especie *Trichoderma* " utilizado en el presente documento se refiere a cualquier organismo fúngico que se ha clasificado previamente como una especie o cepa *Trichoderma*, o que se clasifica actualmente como una especie o cepa *Trichoderma*, o como una especie o cepa *Hypocrea*. En algunos modos de realización, la especie incluye *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, o *Hypocrea jecorina*. También se contemplan para utilizarse como una cepa original las cepas superproductoras de celulasa como *T. longibrachiatum/reesei* RL-P37 (Sheir-Neiss *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 20 (1984) pp. 46-53), y RUT-C30 (ATCC Núm. 56765) y cepa QM9414 (ATCC Núm. 26921).

[0037] La presente información dada a conocer proporciona un método para la detección de un hongo filamentoso deseado mediante el análisis de una población de hongos filamentosos en prueba para la detección de una subpoblación de hongos filamentosos con un índice de metabolismo predeterminado y la selección de un hongo filamentoso deseado de la subpoblación de hongos filamentosos basándose en un parámetro de selección predeterminado. La población de hongos filamentosos en prueba puede ser una población adecuada de la que se puede seleccionar un hongo filamentoso deseado. En algunos modos de realización, la población de hongos filamentosos en prueba es una población de hongos filamentosos genéticamente diversos. Un experto en la materia conoce métodos para la obtención de una población de hongos filamentosos en prueba genéticamente diversos y en el presente documento se describen ejemplos de métodos. En algunos modos de realización, la población de hongos filamentosos en prueba es una población de hongos filamentosos después de la exposición a una condición que induce mutación.

[0038] Aunque no de acuerdo con la invención según se reivindica, según la presente información dada a conocer, se puede obtener una población de hongos filamentosos genéticamente diversos exponiendo la población de hongos filamentosos a un agente que genere diversidad genética en el genoma de las células. En un modo de realización, el agente que genera diversidad genética es un mutágeno que causa cambio(s) nucleótido(s) localizado(s) en el genoma. Las células parentales y las células de prueba se pueden mutagenizar por dichos mutágenos utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede conseguir la mutagénesis de las células mediante irradiación, por ejemplo, luz ultravioleta, rayos X o radiación gamma. De forma alternativa, se puede conseguir la mutagénesis mediante un tratamiento con mutágenos químicos, por ejemplo, ácido nitroso, nitrosaminas, metilnitrosoguanidina, etilmetanosulfonato y análogos de base como 5-bromouracilo. En un modo de realización, se utiliza mutagénesis insercional utilizando transposones, la integración mediada por enzimas de restricción ("REMI" en su sigla en inglés) o transformación mediada por Agrobacterium.

[0039] En algunos modos de realización, el agente que genera diversidad genética en las células parentales o células de prueba es un agente citogenético que causa grandes cambios en el genoma, generalmente a nivel citogenético o cromosómico, tales como, pero sin carácter limitativo, formación de autoploidos, formación de micronúcleos, formación de policariones, reordenamiento cromosómico, redistribución cromosómica, aberración cromosómica, pérdida de cromátidas, recombinación a gran escala, etc. Se conocen muchos de estos agentes, incluyendo, pero sin carácter limitativo, colchicina (utilizada normalmente a 0,1 % en peso/volumen).

[0040] En algunos modos de realización, se aplica el mutágeno a esporas de la cepa parental o cepa de prueba y las esporas que sobreviven se depositan en un medio sólido. Las células se depositan en varias densidades celulares para facilitar el crecimiento e identificación mediante inspección visual u otros medios. En otros modos de realización, en la etapa de diversificación genética se pueden utilizar también otras formas de organismos fúngicos además de esporas. En algunos modos de realización, el agente es un mutágeno que se aplica en una dosis que produce una letalidad de aproximadamente 1-99,9 %. En varios modos de realización, el agente es un mutágeno que se aplica en una dosis que produce una letalidad de aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 %. En algunos modos de realización, el mutágeno es nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina - MNNG) o metanosulfonato de etilo (gas mostaza de nitrógeno). (Véase Gerhardt *et al.* 1994, *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for microbiology, pp. 297-316). Society for microbiology, pp. 297-316).

[0041] La población de hongos filamentosos en prueba se puede analizar para la detección de una subpoblación de hongos filamentosos con un índice de metabolismo predeterminado como se describe en las reivindicaciones mediante cualquier método conocido en la técnica. La población de hongos filamentosos en prueba genéticamente diversos se puede cultivar en un medio que comprende un sustrato metabolizado por los hongos filamentosos y la subpoblación de hongos filamentosos con un índice de metabolismo predeterminado pueden ser aquellos hongos que presentan índices de crecimiento mayores que los del resto de la población de hongos filamentosos. El sustrato proporcionado para determinar el índice de metabolismo puede ser cualquier sustrato conocido por un experto en la materia que permite diferencias discernibles en el índice de metabolismo. Cualquier medio mínimo conocido en la técnica para cultivar hongos filamentosos se puede utilizar para preparar el medio. El sustrato puede ser resistente a la degradación microbiana. El sustrato puede ser celulosa. El medio puede comprender celulosa y la celulosa puede ser la única fuente de carbono y energía. En algunos modos de realización, el medio está sustancialmente libre de disacáridos y monosacáridos. En algunos modos de realización, el cultivo se lleva a cabo en una fase sólida que permite el cultivo y análisis de una población grande de células de prueba en tandas. En algunos modos de realización, la celulosa es celulosa purificada que incluye, pero sin carácter limitativo, celulosa microcristalina, como AVICEL® (FMC Biopolymer, Filadelfia) que, en agua, con cizalla, forma una matriz tridimensional compuesta de microcristales insolubles que forman un gel tixotrópico extremadamente estable.

[0042] En algunos modos de realización, el análisis de la población de hongos filamentosos en prueba para la detección de la subpoblación se puede llevar a cabo en un ensayo de fase sólida. Un ejemplo no limitativo adecuado de un ensayo de fase sólida es la Detección en placa con celulosa. La población de hongos filamentosos en prueba se cultiva en dos capas de medio sólido, y cada capa de medio comprende celulosa como la única fuente o una fuente limitativa de energía o carbono. Las dos capas pueden comprender los mismos ingredientes e incluso las mismas concentraciones de ingredientes y se preparan preferiblemente en una placa. El medio sólido comprende preferentemente agar, por ejemplo, 1,5 % (en peso/volumen) de agar. La capa inferior comprende una población de células de prueba, preferentemente esporas, mientras que la capa superior no comprende ninguna célula fúngica. La placa que comprende una capa superior y las células fúngicas de la capa inferior se incuban a una temperatura durante un periodo de tiempo para que las células fúngicas crezcan en el medio sólido. El grosor de la capa superior es uniforme en toda la placa y controlado para que las células fúngicas de crecimiento más rápido que consumen celulosa emerjan en la superficie de la capa superior. En algunos modos de realización, las células mejoradas de la subpoblación de hongos filamentosos son las que presentan índices de crecimiento mayores que el del percentil 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 98 en el índice de crecimiento de dicha población de células de prueba. Las células de prueba que rompen la superficie de la capa superior se detectan visualmente y se pueden aislar fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica. Normalmente, el grosor de la capa superior oscila desde aproximadamente 2,5 mm, 5 mm, 7,5 mm, 10 mm, 12,5 mm, 15 mm, 17,5 mm, 20 mm, 25 mm a aproximadamente 30 mm.

[0043] En algunos modos de realización, este ensayo de fase sólida se puede utilizar independientemente o al final del régimen de selección para facilitar el aislamiento de las células mejoradas y clasificar las células mejoradas por índice de crecimiento en celulosa. En algunos modos de realización, el ensayo de fase sólida también se puede llevar a cabo a una temperatura que es superior a la temperatura a la que la población de hongos filamentosos en prueba produce normalmente una enzima celulasa.

[0044] La presente información dada a conocer prevé además la selección del hongo filamentososo deseado a partir de la subpoblación de hongos filamentosos basada en un parámetro de selección predeterminado. El parámetro de selección predeterminado puede ser cualquier parámetro analizable e indica, por ejemplo, la

eficacia de utilización de carbono de un hongo filamentoso en prueba. La eficacia de utilización de carbono se puede analizar mediante una variedad de parámetros, incluyendo, pero sin carácter limitativo, el rendimiento de uno o más polipéptidos deseados o enzimas producidas por el hongo filamentoso, la productividad del hongo filamentoso y la actividad específica de las enzimas producidas por el hongo filamentoso. Aunque no de acuerdo con la invención según se reivindica, el parámetro de selección predeterminado puede indicar estabilidad térmica determinada, por ejemplo, por un nivel de producción superior de una o más proteínas o enzimas a temperatura normal o por la capacidad de mantener un nivel de producción de proteína o enzima que es mejor que las células parentales a temperaturas elevadas.

[0045] Aunque no de acuerdo con la invención según se reivindica, según la presente información dada a conocer, el rendimiento se podría determinar, por ejemplo, midiendo la cantidad (gramo) de polipéptido o enzima producida por gramo de entrada de carbono. En algunos modos de realización, la entrada de carbono corresponde a la cantidad de carbono proporcionada al hongo filamentoso, o podría corresponder a la cantidad de carbono consumido por el hongo filamentoso en prueba. La productividad se puede determinar, por ejemplo, midiendo la producción de una proteína, por ejemplo, cantidad (gramo) de polipéptido o enzima producida en un periodo de tiempo predeterminado en relación a una cantidad predeterminada de hongos filamentosos en prueba. Aunque no de acuerdo con la invención según se reivindica, los métodos de la presente información dada a conocer podrían prever también la selección de hongos filamentosos que producen un polipéptido o una enzima con mayor rendimiento, mayor productividad, mayor actividad específica o cualquier combinación de los mismos. En algunos modos de realización, el hongo filamentoso produce además un polipéptido o enzima que ha mejorado la estabilidad térmica.

[0046] Aunque no de acuerdo con la invención según se reivindica, las enzimas o polipéptidos deseados de la presente información dada a conocer incluyen, sin carácter limitativo, celulasa, xilanasas, glucoamilasa, amilasa, lacasa, proteasa, fitasa o hemicelulasa. El parámetro de selección puede indicar la eficacia de utilización de carbono de un hongo filamentoso que produce una celulasa, xilanasas, glucoamilasa, amilasa, lacasa, proteasa, fitasa o hemicelulasa. El parámetro de selección puede comprender además un indicador correspondiente a la productividad de una celulasa, xilanasas, glucoamilasa, amilasa, lacasa, proteasa, fitasa o hemicelulasa expresada en el hongo filamentoso en prueba.

[0047] En algunos modos de realización, la población de hongos filamentosos en prueba son hongos filamentosos preseleccionados. Los criterios de preselección pueden ser cualquier criterio analizable, incluyendo, pero sin carácter limitativo, la resistencia a un agente antibiótico. El antibiótico puede ser cualquier antibiótico conocido en la técnica e incluye, pero sin carácter limitativo, bialafos, ciclohexamida, tunicamicina, griseofulvina, nikomicina Z, caspofungina, actinomicina D, brefeldina A e higromicina y antibióticos poliénicos. Ejemplos no limitativos adecuados de antibióticos poliénicos incluyen nistatina y anfotericina B.

[0048] Los métodos de la presente información dada a conocer se pueden utilizar para la detección de hongos filamentosos de cualquier cepa deseable. En algunos modos de realización, el hongo filamentoso en prueba se selecciona del grupo consistente en *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Endothia*, *Fusarium*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, *Trichophyton*, *Trametes*, y *Pleurotus*. En algunos modos de realización, el hongo filamentoso en prueba es *Trichoderma*. En algunos modos de realización, el hongo filamentoso en prueba es *T. reesei*. En algunos modos de realización, el hongo filamentoso en prueba es *T. reesei* que utiliza celulosa como su fuente de carbono.

[0049] Aunque no de acuerdo con la invención según se reivindica, la presente información dada a conocer también proporciona un hongo filamentoso obtenido mediante los métodos analizados anteriormente. El hongo filamentoso puede ser *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*. El hongo filamentoso obtenido mediante los métodos de la presente información dada a conocer puede ser *T. reesei* y puede producir una mezcla de celulasas con una actividad predeterminada. La actividad puede ser cualquier actividad para la que se desea una cepa con propiedades mejoradas. La actividad puede ser la sacarificación.

[0050] La presente información dada a conocer proporciona un método para la detección de un hongo filamentoso deseado mediante el análisis de una población de hongos filamentosos en prueba basándose en una combinación de dos o más parámetros de selección. La población de hongos filamentosos en prueba se puede analizar basándose en dos parámetros de selección, un primer parámetro de selección y un segundo parámetro de selección. Se puede elegir cualquier combinación de parámetros de selección para obtener la cepa mejorada deseada de un hongo filamentoso. El primer parámetro de selección puede indicar el índice de metabolismo de un hongo filamentoso en prueba y el segundo parámetro de selección puede indicar la capacidad de un hongo filamentoso en prueba para resistir a un antibiótico. El primer parámetro de selección puede indicar el índice de metabolización de un sustrato que es resistente a la degradación microbiana, por ejemplo, celulosa.

[0051] La presente información dada a conocer también proporciona un método para la detección de un hongo filamentoso deseado mediante el análisis de una población de hongos filamentosos en prueba basándose en un parámetro de selección predeterminado que indica el índice de metabolismo de un hongo filamentoso en prueba de, por ejemplo, un sustrato que es resistente a la degradación microbiana. Aquí la población de hongos filamentosos en prueba ha sido preseleccionada frente a un antibiótico.

[0052] Los aspectos de la presente información dada a conocer se pueden entender más teniendo en cuenta los siguientes ejemplos.

7. EJEMPLOS

EJEMPLO 7.1 Preparación de mutantes, medios y soluciones

[0053] Se utilizó un medio de detección con celulasa para aislar las variantes con producción de proteína mejorada. El medio de detección con celulasa contenía 20 ml de solución madre 50X de Vogels, 0,5 g de AVICEL® (FMC Biopolymer, Filadelfia), y 20 g de agar, 980 ml de dH₂O. La solución madre 50X de Vogels se preparó disolviendo: (1) 150 g de Na₃Citrato·2H₂O; 10 g de MgSO₄·7H₂O; y 5 g de CaCl₂·2H₂O en 300 ml de dH₂O; (2) 250 g de KH₂PO₄ en 500 dH₂O; (3) 100 g de NH₄NO₃ en 200 ml de dH₂O. Las soluciones se añadieron juntas y se añadió 5 ml de solución de oligoelementos de Vogels y 2,5 ml de solución de biotina de Vogels. La solución de oligoelementos de Vogels contenía 1 litro de dH₂O, 50 g de ácido cítrico; 50 g de ZnSO₄·7H₂O; 10 g de Fe(NH₄)₂SO₄·6H₂O; 2,5 g de CuSO₄·5H₂O; 0,5 g de MnSO₄·4H₂O; 0,5 g de H₃BO₃ (ácido bórico); y 0,5 g de NaMoO₄·2H₂O. (véase Davis *et al.*, 1970, *Methods in Enzymology* 17A, 79 -143; y Davis *et al.*, 2000, *Neurospora, Contributions of a Model Organism*, Oxford University Press, para información sobre el medio mínimo de Vogels). La solución de biotina de Vogels comprende 0,1 g de d-Biotina en 1 litro de agua. Se examinó la producción total de proteína en matraces de agitación incubando mutantes a 28°C, 150 rpm, durante 96 h en matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio mínimo de lactosa como se describe en Ilmen *et al.*, 1997, *App Environ Microbiol* 63, 1298-1306, salvo que se incluyeron 100 mM de piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico) (PIPES; Calbiochem) para mantener el pH a 5,5. Se realizaron ensayos de proteínas en sobrenadantes después de la precipitación TCA utilizando un ensayo BCA proporcionado por Pierce (Rockford, IL).

[0054] Cualquier medio mínimo conocido en la técnica para cultivar hongos filamentosos se puede utilizar para preparar el medio para su utilización en la etapa de cultivo.

[0055] Los siguientes experimentos empezaron con la cepa *Trichoderma reesei* A83 que es una cepa muy productiva en relación con la cepa RL-P37. Para generar diversidad genética, se mutaron las células con el compuesto de metilación N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG). NTG es uno de los mutágenos disponibles más potentes; induce principalmente mutaciones de transición de base del tipo GC a AT (aunque las transiciones, transversiones y desplazamientos del cambio de lectura AT a GC surgen en frecuencias bajas). Se preparó una curva de destrucción cuando se mutó una cepa por primera vez. Empezando en tiempo cero, las muestras se tomaron cada 30 minutos y se realizó un recuento de esporas viables. Una vez se estableció la curva de destrucción, solo se realizaron el tiempo cero y el recuento viable final para asegurar que se había obtenido el porcentaje de destrucción correcto. Por ejemplo, se prepararon una biblioteca de destrucción del 50 % y una biblioteca de destrucción del 99 % incubando las esporas con NTG durante 1,5 horas y 3 horas, respectivamente. Cepas mejoradas derivadas de RL-P37 que incluyen A83, T4, NY27 y 41G obtenidas utilizando una biblioteca de destrucción del 99 %. Después de la incubación, se eliminó el NTG lavando las esporas al menos tres veces en agua. Se prepararon alícuotas de las esporas mutadas y se depositaron en glicerol a -70°C.

[0056] Se prepararon placas fúngicas nuevas y se utilizaron para obtener una suspensión de esporas que contenía aproximadamente 1 x 10⁹ unidades formadoras de esporas/ml. El número de unidades formadoras de esporas/ml se determinó utilizando un hemocitómetro. Se preparó nuevamente una solución de NTG (Aldrich-4991) a una concentración de 15 mg/ml en DMSO y se añadió a la suspensión de esporas fúngicas a una concentración final de 1,0 mg/ml. A continuación, la suspensión de esporas fúngicas se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que se obtuvo la destrucción de 99 % deseada.

[0057] Aislamiento de T4. Se preparó el medio de detección con celulasa y se enfrió a 55°C en un baño de agua. En una placa de Petri pequeña (82 mm), una alícuota que contenía aproximadamente un millón de esporas mutadas se dispuso en un círculo aproximadamente a la mitad entre el centro y el borde de la placa y se añadieron 10 ml del medio de detección con celulasa (descrito anteriormente). La placa se giró posteriormente para que las esporas se dispersaran en medio de la placa, pero no hasta los bordes y se dejó endurecer durante aproximadamente 5-10 minutos. Se añadieron 25 ml de medio de detección con celulasa y se dejó endurecer. A continuación, se añadieron otros 10 ml de medio de detección con celulasa y se incubaron las placas a 28°C durante toda la noche. Al día siguiente, se comprobó la superficie de la placa cada cuatro horas para observar el crecimiento utilizando un microscopio de disección. Para cada biblioteca, se determinó el tiempo aproximado en el que las colonias alcanzaron la superficie de la placa.

[0058] Los primeros aislados de 1 a 3 que alcanzaron la superficie del agar se recogieron utilizando una cuchilla estéril, ignorando las colonias que surgieron alrededor de los bordes. Se observó la colonia bajo el microscopio y se utilizó la cuchilla para tocar la superficie de la colonia, con cuidado de no ahondar en el agar. Se retiró una pequeña parte de micelio y se colocó en PDA y se incubó a 28°C. Una vez crecidos, los aislados se evaluaron con respecto a la producción total de proteínas en matraces de agitación.

[0059] Después de la primera ronda de detección, se observó que el T4 producía aproximadamente un 25 % más de proteína total en comparación con el A-83 parental (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de proteína en matraces de agitación de RL P-37, A-83, T4, NY27, y 41G.

# Cepa	Proteína g/l
RL P-37	0,6 +/- 0,04
A-83	0,9 +/- 0,07
T4	1,2 +/- 0,07
NY27	1,8 +/- 0,05
41G	2,4 +/- 0,10

[0060] Aislamiento de NY27. Se mutaron esporas de T4 con NTG hasta que se obtuvo una destrucción de 99 % como se describe anteriormente. Las esporas mutadas se depositaron en agar PDA (Difco) que contenía 10 µg/ml de nistatina.

[0061] Antibióticos poliénicos, como la nistatina, se unen al esterol, ergosterol, en la membrana de la célula fúngica haciendo que la membrana citoplasmática filtre, resultando en la muerte. Aunque no ligado a ninguna teoría, la producción de proteínas mejorada puede ser debida a una secreción mejorada resultante de alteraciones en la membrana celular que resulta en mayor permeabilidad y/o sobreexpresión de genes transportadores de eflujo.

[0062] Las colonias resistentes a la nistatina se aislaron y examinaron con respecto a una producción total de proteínas en matraces de agitación. Uno de los mejores mutantes fue el NY 27, que produjo aproximadamente un 33 % más de proteína total que el T4 en matraces de agitación (Tabla 1).

[0063] Aislamiento de 41G. El NY27 se mutó con NTG hasta que se obtuvo un 99 % de degradación. Las esporas mutadas se analizaron de manera idéntica como en el aislamiento del T4.

[0064] Se preparó el medio de detección con celulosa y se enfrió a 55°C en un baño de agua. En una placa de Petri pequeña (82 mm), una alícuota que contenía aproximadamente un millón de esporas mutadas se dispuso en un círculo aproximadamente a la mitad entre el centro y el borde de la placa y se añadieron 10 ml del medio de detección con celulosa (descrito anteriormente). La placa se giró posteriormente para que las esporas se dispersaran en medio de la placa, pero no hasta los bordes y se dejó endurecer durante aproximadamente 5-10 minutos. Se añadieron 25 ml de medio de detección con celulosa y se dejó endurecer. A continuación, se añadieron otros 10 ml de medio de detección con celulosa y se incubaron las placas a 28°C durante toda la noche. Al día siguiente, se comprobó la superficie de la placa cada cuatro horas para observar el crecimiento utilizando un microscopio de disección. Para cada biblioteca, se determinó el tiempo aproximado en el que las colonias alcanzaron la superficie de la placa.

[0065] Los primeros aislados de 1 a 3 que alcanzaron la superficie del agar se recogieron utilizando una cuchilla estéril, ignorando las colonias que surgieron alrededor de los bordes. Se observó la colonia bajo el microscopio y se utilizó la cuchilla para tocar la superficie de la colonia, con cuidado de no ahondar en el agar. Se retiró una pequeña parte de micelio y se colocó en PDA y se incubó a 28°C. Una vez crecidos, los aislados se evaluaron con respecto a la producción total de proteínas en matraces de agitación.

[0066] Se observó que el mutante 41G producía aproximadamente un 25 % más de proteína total en comparación con el NY27 parental (Tabla 1). La figura 1 muestra la producción de proteína total de A83 y 41G en 120 h en una fermentación de celulosa de 14 l. La proteína total se muestra como porcentaje de A83 (control). El peso seco celular (DCW en su sigla en inglés) se expresa en g/l. El DCW se mide filtrando una cantidad conocida de caldo total para eliminar la masa celular, secar la masa celular y determinar el peso (g) por litro del caldo total. La figura 2 muestra la productividad específica de 41G en 120 h en una fermentación de celulosa de 14 l en comparación con el control A-83. La productividad específica (gramos de proteína por gramo de DCW/LH) se muestra como porcentaje de A-83 (control). El peso seco celular (DCW) se expresa en g/l. La figura 3 muestra la evolución de 4 1 G utilizando la detección en placa con celulosa y detección de resistencia a nistatina y mejoras en el rendimiento (gramos de proteínas/gramos de carbono/LH) y productividad (gramos de proteína/LH) en

cepas fermentadoras de 14 l en 41G el linaje 41 G. Los resultados se muestran como porcentaje de A-83 (control).

5 **[0067]** Los mutantes T4 y 41G se hicieron crecer en fermentadores de 14 l en fermentaciones de alimentación en tandas óptimas para la producción de celulasa utilizando un medio como se describe en Ilmen *et al.*, 1997, *App Environ Microbiol* 63, 1298-1306, a excepción de 100 mM de piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico) (PIPES; Calbiochem). Otros métodos son típicos para los expertos en la materia. La figura 3 muestra las mejoras de productividad y rendimiento en relación con la cepa A-83.

EJEMPLO 7.2: Sacarificación

10 **[0068]** Se llevaron a cabo reacciones de T4 en una placa de ensayo de microtitulación estándar a 50°C durante 5 días con residuos de maíz pretratados con ácido (13 % sólidos, aproximadamente 7 % celulosa) con 5, 10 y 20 miligramos de celulasa por gramo de celulosa. Hubo diecisiete muestras de fermentación de A-83 diferentes (analizadas por duplicado) promediadas y cuatro muestras de T4 diferentes (analizadas por duplicado y cuadruplicado) promediadas. La celulasa de T4 superó a la celulasa de A-83 en la placa de ensayo. Para el 41G, una dosis de 8 mg/g de celulosa que contenía 4,3 % (en peso/volumen) de sólidos de PYP (Liriodendron
15 pretratado con ácido diluido) que contenía 2,5 % (en peso/volumen) de celulosa se administró con cantidades iguales de A-83 y 41G y se incubó a 38°C, con pH 5,0 con mezcla continua por inversión (cada 20 minutos) en tubos cerrados durante 168 h. El porcentaje de sacarificación de celulosa de PYP se determinó conforme pasaba el tiempo. Utilizando una celulosa producida por T4, el porcentaje de sacarificación mejoró en un 10-15 % en comparación con la celulasa de A-83. La celulasa de 41G mostró un porcentaje de sacarificación mejorado en
20 comparación con la celulasa de A-83 (Figura 4).

25

30

Reivindicaciones

1. Un método para la detección de un hongo filamentoso con mayor eficacia de utilización de carbono que comprende:
- 5 (i) el análisis de una población de hongos filamentosos de prueba con un sustrato de celulosa para la detección de una subpoblación de hongos filamentosos con un índice de metabolismo predeterminado que presenta índices de crecimiento superiores a los del percentil 50 en el índice de crecimiento de dicha población de hongos de prueba y,
- 10 (ii) la selección de un hongo filamentoso a partir de dicha subpoblación de hongos filamentosos basada en la producción de una celulasa con mayor actividad específica en comparación con células parentales del hongo filamentoso, que indica una mayor eficacia de utilización de carbono de dicho hongo filamentoso seleccionado.
2. Método de la reivindicación 1, donde el parámetro de selección corresponde a la producción de una celulasa con mayor actividad específica en el hongo filamentoso seleccionado en relación a una cantidad predeterminada de carbono proporcionada al hongo filamentoso de prueba.
- 15 3. Método de la reivindicación 1, donde el parámetro de selección corresponde a la producción de una celulasa con mayor actividad específica en el hongo filamentoso seleccionado en relación a una cantidad predeterminada de carbono consumido por el hongo filamentoso de prueba.
4. Método de la reivindicación 1, que comprende la determinación de la productividad de la celulasa en el hongo filamentoso seleccionado mediante la determinación de la producción de la celulasa en un periodo de tiempo predeterminado en relación a una cantidad predeterminada del hongo filamentoso seleccionado.
- 20 5. Método de la reivindicación 1, donde el análisis de la población de hongos filamentosos de prueba para la detección de la subpoblación se lleva a cabo en un ensayo de fase sólida.
6. Método de la reivindicación 1, donde la población de hongos filamentosos de prueba es una población de hongos filamentosos preseleccionados frente a un antibiótico, que es opcionalmente un antibiótico poliénico y/o que se selecciona opcionalmente del grupo consistente en nistatina, anfotericina B, bialafos, ciclohexamidina, tunicamicina, griseofulvina, nikomicina Z, caspofungina, actinomicina D, brefeldina A e higromicina.
- 25 7. Método de la reivindicación 1, donde el hongo filamentoso de prueba se selecciona del grupo consistente en *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochiobolus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Endothia*, *Fusarium*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolytocladium*, *Trichophyton*, *Trametes*, y *Pleurotus*.
- 30 8. Método de la reivindicación 1, donde el hongo filamentoso de prueba es *T. reesei* y utiliza celulosa como fuente de carbono.
- 35

FIG. 1

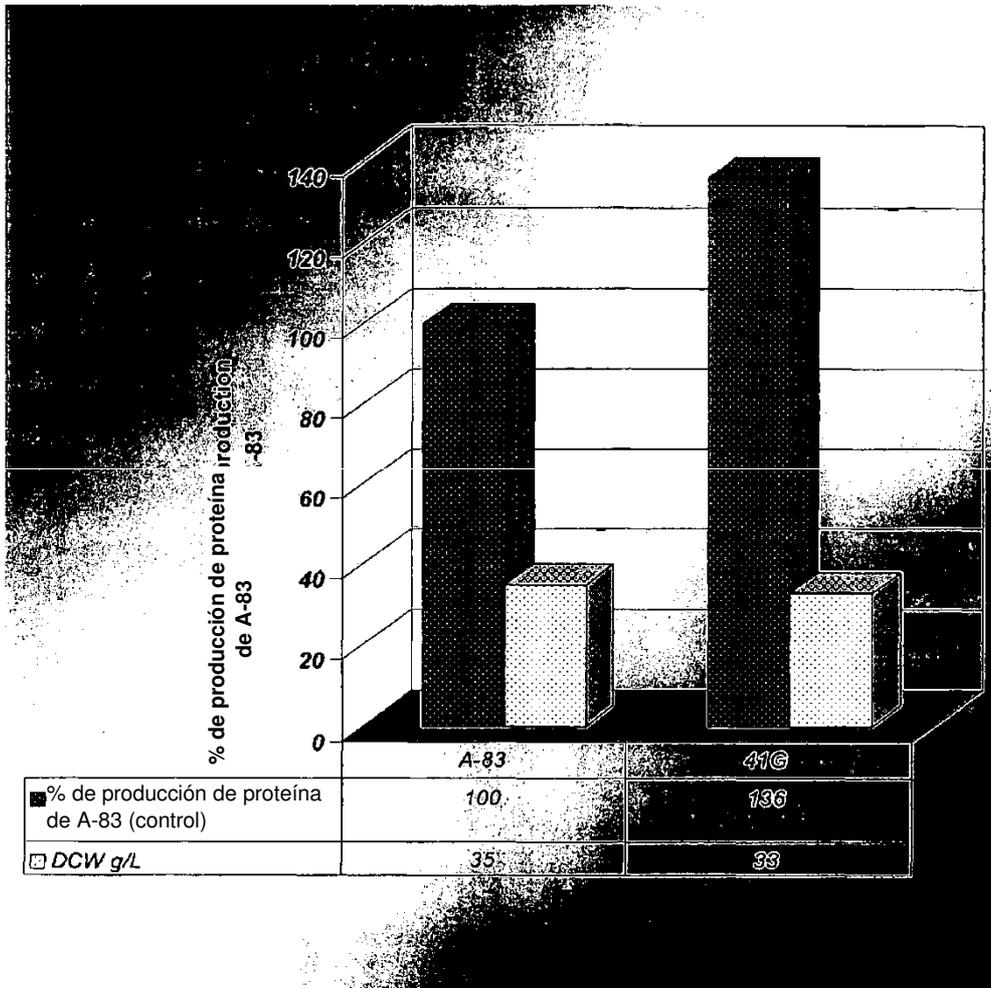


FIG. 2

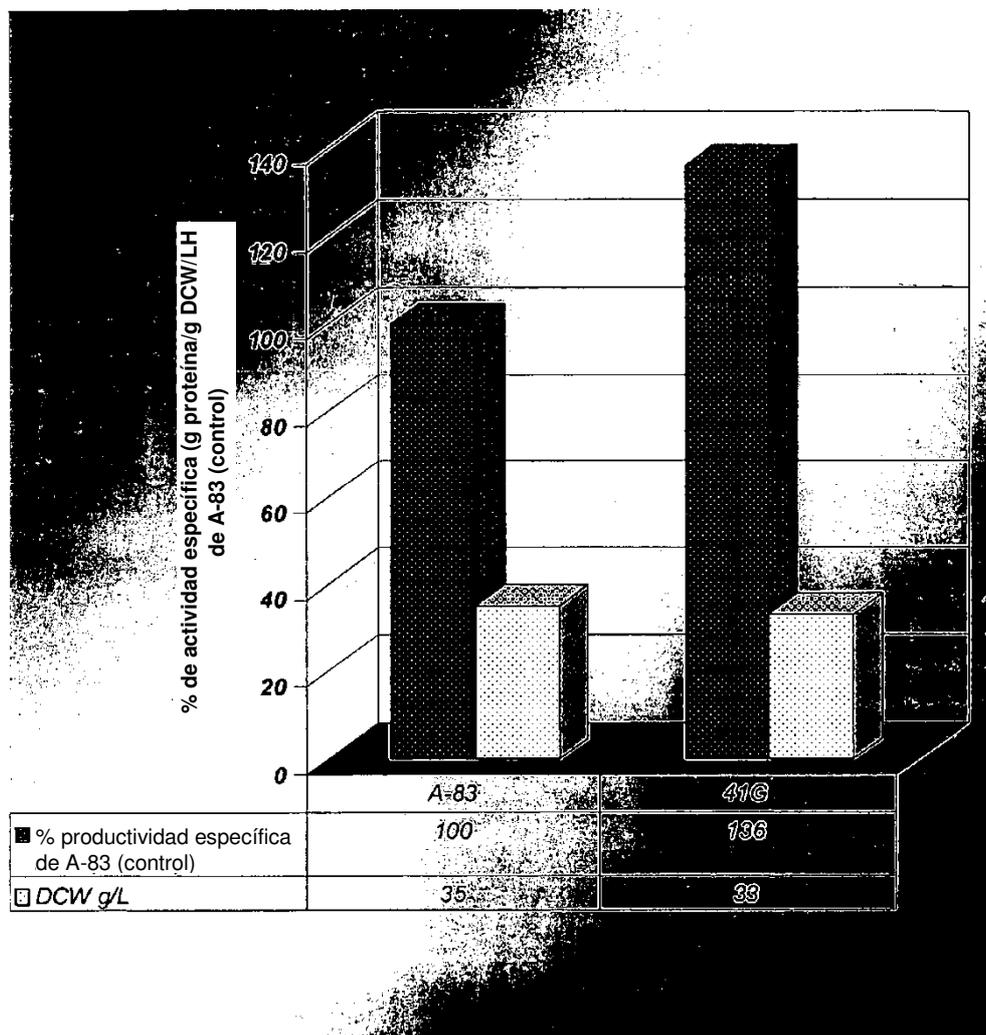


FIG. 3

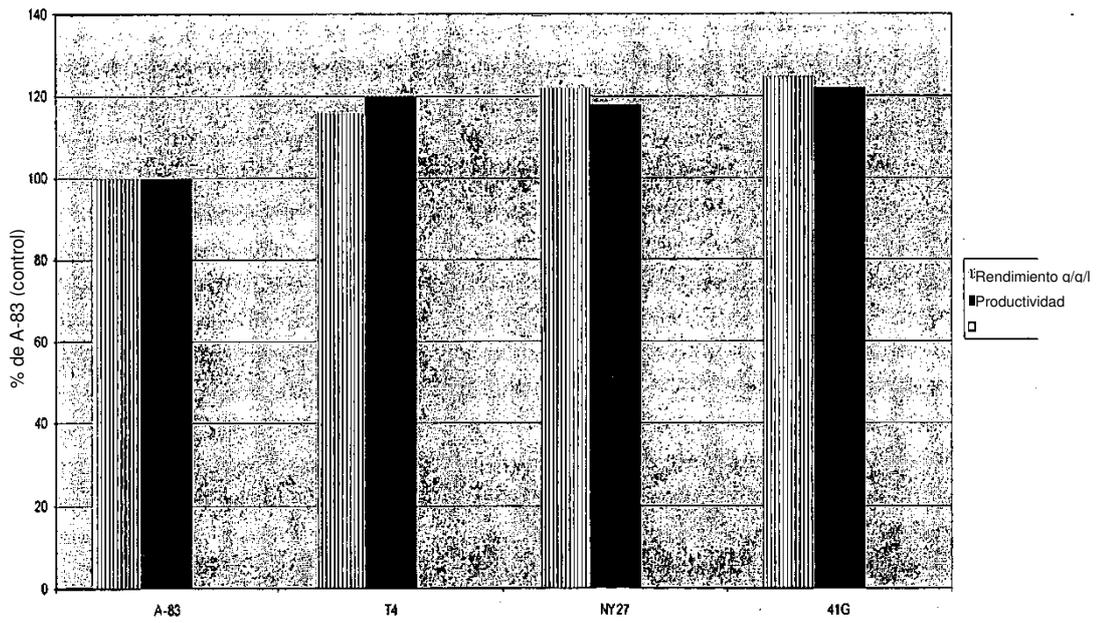


FIG. 4.

