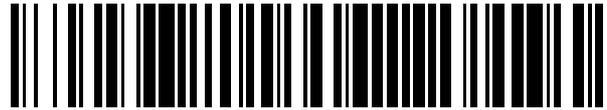


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 467**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12N 9/42** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005 E 05855774 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1838849**

54 Título: **Variantes de celulasas CBH2 de Hypocrea jecorina**

30 Prioridad:

**30.12.2004 US 640398 P**

**25.02.2005 US 656863 P**

**28.03.2005 US 666072 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.12.2015**

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)**  
**925 Page Mill Road**  
**Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**AEHLE, WOLFGANG;**  
**CALDWELL, ROBERT M.;**  
**DANKMEYER, LYDIA;**  
**GOEDEGEBUUR, FRITS;**  
**KELEMEN, BRADLEY R.;**  
**MITCHINSON, COLIN;**  
**NEEFE, PAULIEN y**  
**TEUNISSEN, PAULINE**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 554 467 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

Variantes de celulasas CBH2 de *Hypocrea jecorina*

## CAMPO

5 [0001] La presente descripción se refiere a variantes de enzimas de celobiohidrolasa y secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos que tienen actividad de celobiohidrolasa. La exposición también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores, y células huésped que comprenden las secuencias de ácido nucleico, así como métodos para producir polipéptidos de variantes de CBH recombinantes.

## REFERENCIAS

## [0002]

- 10 1. Sheehan e Himmel *Biotechnology Progress* 15, pp 817-827 (1999)  
 2. Matti Linko *Proceedings of the Second TRICEL Symposium on Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolase* pp 9-11 (1993)  
 3. Tuula T. Teeri *Trends in Biotechnology* 15, pp 160-167 (1997)  
 15 4. T.T. Teeri *et al. Spec. Publ. - R. Soc. Chem.*, 246 (Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering), pp 302-308. (1999)  
 5. PDB reference 1QK2 (Cel6A = CBH2) J.-Y. Zou, G.J. Kleywegt, J. Stahlberg, H. Drigues, W. Nerinckx, M. Claeysens, A. Koivula, T.T. Teeri, T.A Jones, *Structure (LONDON)*, V. 7 p. 1035 (1999)  
 6. PDB reference 2BVW Structural changes of the active site tunnel of *Humicola insolens* cellobiohydrolase, Cel6A, upon oligosaccharide binding., Varrot A, Schulein M, Davies GJ, *Biochemistry* 1999 Jul 13;38(28):8884-91.  
 20 7. PDB reference 1 DYS Structure and function of *Humicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 Å resolution., Davies GJ, Brzozowski AM, Dauter M, Varrot A, Schulein M, *Biochem J* 2000 May 15;348 Pt 1:201-7.

## ANTECEDENTES

25 [0003] La celulosa y la hemicelulosa son los materiales vegetales más abundantes producidos mediante fotosíntesis. Pueden degradarse y utilizarse como fuente de energía por parte de numerosos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos, que producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar los sustratos poliméricos en azúcares monoméricos (Aro *et al. J. Biol. Chem.*, vol. 276, n.º 26, pp. 24309-24314, 29 Junio 2001). Puesto que se acercan los límites de los recursos no renovables, el potencial de la celulosa para convertirse en un importante recurso de energía renovable es enorme (Krishna *et al., Bioresource Tech.* 77:193-196, 2001). La utilización efectiva de la celulosa a través de procesos biológicos es un enfoque para superar la escasez de alimentos, piensos y combustibles (Ohmiya *et al., Biotechnol. Gen. Engineer. Rev.* vol. 14, pp. 365-414, 1997).

35 [0004] Las celulasas son enzimas que hidrolizan celulosa (enlaces beta-1,4-glucano o beta D-glucosídicos) dando lugar a la formación de glucosa, celobiosa, celooligosacáridos, y similares. Las celulasas se han dividido tradicionalmente en tres clases principales: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) ("EG"), exoglucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) ("CBH") y beta-glucosidasas ([beta] -D-glucósido glucohidrolasa; EC 3.2.1.21) ("BG"). (Knowles *et al., TIBTECH* 5, 255-261, 1987; Schülein, *Methods Enzymol.*, 160, 25, pp. 234-243, 1988). Las endoglucanasas actúan principalmente en las partes amorfas de la fibra de celulosa, mientras que las celobiohidrolasas son también capaces de degradar celulosa cristalina (Nevalainen y Penttilä, *Mycota*, 303-319, 1995). De esta manera, es necesaria la presencia de una celobiohidrolasa en un sistema de celulasas para la solubilización eficaz de la celulosa cristalina (Suurnakki, *et al. Cellulose* 7:189-209, 2000). La beta-glucosidasa actúa para liberar unidades de D-glucosa a partir de celobiosa, celooligosacáridos, y otros glucósidos (Freer, *J. Biol. Chem.* vol. 268, n.º 13, pp. 9337-9342, 1993).

45 [0005] Se sabe que las celulasas son producidas por un gran número de bacterias, levaduras y hongos. Algunos hongos producen un sistema de celulasas completo capaz de degradar formas cristalinas de celulosa, de manera que las celulasas se producen fácilmente en grandes cantidades a través de la fermentación. Los hongos filamentosos desempeñan un papel especial, puesto que muchas levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, carecen de la capacidad para hidrolizar celulosa. Véase, por ejemplo, Aro *et al.*, 2001; *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, eds. Aubert, J. P. *et al.*, Academic Press, 1988; Wood *et al., Methods in Enzymology*, vol. 160, n.º 9, pp. 87-116, 1988, y Coughlan, *et al.*,

50

[0006] "Comparative Biochemistry of Fungal and Bacterial Cellulolytic Enzyme Systems" *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, pp. 11-30 1988.

55 [0007] Las clasificaciones de las celulasas fúngicas de CBH, EG y BG se pueden ampliar adicionalmente para incluir múltiples componentes dentro de cada clasificación. Por ejemplo, se han aislado múltiples CBH, EG y BG de una variedad de fuentes fúngicas, incluyendo *Trichoderma reesei* (también denominada *Hypocrea jecorina*),

que contiene genes conocidos para 2 CBH, es decir, CBH I ("CBH1") y CBH II ("CBH2"), al menos 8 EG, es decir, EG I, EG II, EG III, EGIV, EGV, EGVII y EGVIII, y al menos 5 BG, es decir, BG1, BG2, BG3, BG4 y BG5. EGIV, EGVII y EGVIII también tienen actividad de xiloglucanasa.

5 [0008] Con el fin de convertir de manera eficaz celulosa cristalina en glucosa, se necesita el sistema de celulasas completo que comprende componentes de cada una de las clasificaciones CBH, EG y BG, con componentes aislados menos eficaces en la hidrólisis de celulosa cristalina (Filho *et al.*, *Can. J. Microbiol.* 42:1-5, 1996). Se ha observado una relación sinérgica entre componentes de celulasa de diferentes clasificaciones. En concreto, las celulasas de tipo EG y las celulasas de tipo CBH interactúan sinérgicamente para degradar celulosa de manera más eficiente. Véase, por ejemplo, Wood, *Biochemical Society Transactions*, 611th Meeting, Galway, vol. 13, pp. 10 407-410, 1985.

[0009] Las celulasas se conocen en la técnica por ser útiles en el tratamiento de tejidos con el fin de mejorar la capacidad de limpieza de las composiciones detergentes, por el uso como agente suavizante, para mejorar el tacto y la apariencia de los tejidos de algodón, y similares (Kumar *et al.*, *Textile Chemist and Colorist*, 29:37-42, 1997).

15 [0010] Se han descrito composiciones detergentes que contienen celulasa con rendimiento de limpieza mejorado (Patente estadounidense n.º 4.435.307; solicitudes GB n.º 2.095.275 y 2.094.826) y para su utilización en el tratamiento de telas para mejorar el tacto y la apariencia del tejido (Patentes estadounidenses n.º 5.648.263, 5.691.178, y 5.776.757; solicitud GB n.º 1.358.599; *The Shizuoka Prefectural Hamamatsu Textile Industrial Research Institute Report*, Vol. 24, pp. 54-61, 1986).

20 [0011] Por lo tanto, las celulasas producidas en hongos y bacterias han recibido una atención significativa. En concreto, se ha demostrado que la fermentación de *Trichoderma spp.* (por ejemplo, *Trichoderma longibrachiatum* o *Trichoderma reesei*) produce un sistema de celulasas completo capaz de degradar formas cristalinas de la celulosa.

25 [0012] Aunque las composiciones de celulasa se han descrito previamente, se siguen necesitando composiciones de celulasas nuevas y mejoradas para utilizarse en detergentes domésticos, composiciones para lavado a la piedra o detergentes para ropa, etc. Las celulasas que muestran rendimiento mejorado son de interés particular.

#### BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

30 [0013] La exposición proporciona una proteína celulasa aislada, identificada en el presente documento como variante de CBH2, y ácidos nucleicos que codifican una variante de CBH2.

[0014] En un modo de realización es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos V94, P98, G118, M120, M134, T142, L144, M145, T148, T154, L179, Q204, V208, S210, I212, T214, L215, G231, T232, V250, Q276, N285, S291, G308, T312, S316, V323, N325, I333, G334, S343, T349, G360, S380, A381, S386, F411, S413, A416, Q426 y/o A429 en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2). En un primer aspecto es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos V94E, P98L, G118P, M120L, M134G/L/V, T142V, L144G/R/S, M145L, T148Y, T154A, L179A, Q204E, V206L, S210L/R, I212V, T214M/Y, L215I, G231N, T232V, V250I, Q276L, N285Q, S291G, G308A, T312S, S316P, V323L/N/Y, N325D, I333L, G334A, S343P, T349L/V, G360R, S380T, A381T, S386P, F411Y, S413Y, A416G, Q426E y/o A429T en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2).

45 [0015] En un segundo modo de realización está dirigido a una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos V94, P98, G118, M120, M134, T142, M145, T148, T154, L179, Q204, V208, S210, I212, L215, G231, T232, V250, Q276, N285, S291, G308, T312, S316, V323, N325, I333, G334, S343, T349, G360, S380, A381, S386, F411, S413, A416, Q426 y/o A429 en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2). En un primer aspecto es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos V94E, P98L, G118P, M120L, M134V, T142V, DATABASE EMBL precursor de Celobiohidrolasa II (EC 3.2. 1 .91) 22 Octubre 2004, ZAHRI S. *ET AL* (n.º de acceso base de datos EBI AY76109) describe la secuencia de nucleótido y la estructura primaria deducida de celobiohidrolasa II de *Trichoderma parceramosum*.

50 [0016] BASE DE DATOS GENBANK 23 Septiembre 2004, ZAHRI,S., *ET AL*. (n.º de acceso base de datos NCBI AAU05379) describe la secuencia de nucleótido y la estructura primaria deducida de celobiohidrolasa II de *Trichoderma parceramosum*.

55 [0017] WO04/056981 describe polipéptidos que tienen actividad celobiohidrolasa II y polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos. También se describen constructos de ácido nucleico,

vectores y células huésped que comprenden los constructos de ácido nucleico, así como métodos para producir y utilizar los polipéptidos.

5 **[0018]** WO99/01544 describe composiciones de limpieza que comprenden una o más enzimas que tienen actividad celulolítica donde al menos 25 % del peso total de proteína celulolítica activa deriva de la presencia de una endo-1,4-β-glucanasa de Humicola o celulasa de tipo Humicola de la glicosil hidrolasa de la familia 6, siendo la celulasa de tipo Humicola una enzima que comprende un dominio central catalítico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 35 % homóloga a la SEQ ID NO: 4 descrita. También se describe un método para construir una variante de una endo-beta-1,4-glucanasa de Humicola parental de la familia 6 (Cel6B) o una celulasa de tipo Humicola de la familia 6 cuya variante tiene actividad endo-beta-1,4-glucanasa y compatibilidad detergente mejorada en comparación con la celulasa o endo-beta-1,4-glucanasa parental. También se describen variantes mutadas, por ejemplo, en las posiciones 20, 56, 94, 95, 103, 182, 183 y 318 (numeración Cel6B).

10 **[0019]** M145L, T148Y, T154A, L179A, Q204E, V206L, I212V, L215I, G231N, T232V, V250I, Q276L, N285Q, S291G, G308A, T312S, S316P, V323N, N325D, I333L, G334A, S343P, T349L, G360R, S380T, A381T, S386P, F411Y, S413Y, A416G, Q426E y/o A429T en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2).

15 **[0020]** En un tercer modo de realización es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos P98, M134, V206, I212, T312, S316, F411 y/o S413 en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2). En un primer aspecto es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos P98L, M134G/L/V, V206L, I212V, T312S, S316P, F411Y y/o S413Y en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2).

20 **[0021]** En un cuarto modo de realización es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más residuos en una región espacial y dicha región espacial se selecciona del grupo consistente en (210, 214), (253, 255, 257, 258), (411, 413, 415), (412, 414, 416), (312, 313), 323, (212, 149, 152), (134, 144) y 98 en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2). En un primer aspecto es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante se selecciona del grupo consistente en S316P/V323L, S316P/V323Y, V206L/S210R/S316P, V206L/S316P, V206L/S210L/T214M/S316P, V206L/S210R/T214Y/S316P, M134G/L144G/S316P, M134L/L144R/S316P y M134L/L144S/S316P en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2).

25 **[0022]** En un quinto modo de realización es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos P98, M134, L144, V206, S210, T214, S316, V323 y/o S413 en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2). En un primer aspecto es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o más de los residuos P98L, M134L/V, L144R, V206L, S210L/R, T214Y, S316P, V323Y y/o S413Y en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2). En un segundo aspecto es una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante se selecciona del grupo consistente en 98L/134V/206L/210R/214Y/316P/413Y, 98L/134L/144R/316P/413Y, 98L/134L/144R/206L/210R/214Y/316P/413Y, 98L/134V/316P/323Y/413Y, 98L/134V/206L/210R/214Y/316P/323Y/413Y, 98L/134L/144R/316P/323Y/413Y, 98L/134L/144R/206L/210R/214Y/316P/323Y/413Y, 98L/134L/144R/210R/214Y/316P/323Y/413Y y 98L/134L/144R/210L/214Y/316P/323Y/413Y en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2).

30 **[0023]** En un sexto modo de realización es un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad celobiohidrolasa.

35 **[0024]** En un primer aspecto es un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad celobiohidrolasa, cuyo polipéptido es una variante de una glicosil hidrolasa de la familia 6, y donde dicho ácido nucleico codifica una sustitución en un residuo que es sensible al estrés térmico en el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico, donde dicha variante de celobiohidrolasa se deriva de celobiohidrolasa de *H. jecorina*. En un segundo aspecto es un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad celobiohidrolasa, cuyo polipéptido es una variante de una glicosil hidrolasa de la familia 6, y donde dicho ácido nucleico codifica una sustitución en un residuo que efectúa procesividad de enzima en el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico, donde dicha variante de celobiohidrolasa se deriva de celobiohidrolasa de *H. jecorina*. En un tercer aspecto es un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad celobiohidrolasa, cuyo polipéptido es una variante de una glicosil hidrolasa de la familia 6, y donde dicho ácido nucleico codifica una sustitución en un residuo que efectúa inhibición del producto en el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico, donde dicha variante de celobiohidrolasa se deriva de celobiohidrolasa de *H. jecorina*.

40 **[0025]** En otro aspecto es un ácido nucleico aislado que codifica una variante de celulasa CBH2, en el que dicha variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a uno o más de los residuos V94, P98, G118, M120, M134, T142, M145, T148, T154, L179, Q204, V206, I212, L215, G231, T232, V250, Q276, N285, S291, G308, T312, S316, V323, N325, I333, G334, S343, T349, G360, S380, A381, S390, F411, S413, A416, Q426 y/o A429 en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2).

**[0026]** En un séptimo modo de realización es un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de CBH2. En un aspecto hay un constructo que comprende el ácido nucleico de codificar la variante de CBH2 operativamente unida a una secuencia reguladora.

5 **[0027]** En un octavo modo de realización es un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de CBH2. En un aspecto hay un constructo que comprende el ácido nucleico de codificar la variante de CBH2 operativamente unida a una secuencia reguladora.

**[0028]** En un noveno modo de realización es una célula huésped transformada con el vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de CBH2.

10 **[0029]** En un décimo modo de realización es un método para producir una variante de CBH2 que comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula huésped transformada con el vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones adecuadas para producir una variante de CBH2;

(b) obtener dicha variante de CBH2 producida.

15 **[0030]** En un undécimo modo de realización es una composición detergente que comprende un surfactante y una variante de CBH2. En un aspecto de este modo de realización el detergente es un detergente para ropa. En un segundo aspecto de este modo de realización el detergente es un detergente para platos. En un tercer aspecto, la variante de celulasa CBH2 se utiliza en el tratamiento de un tejido que contiene celulosa, en concreto, en el tejido vaquero teñido de índigo o lavado a la piedra.

20 **[0031]** En un duodécimo modo de realización es un aditivo para alimentación animal que comprende una variante de CBH2.

**[0032]** En un décimo tercer modo de realización es un método para tratar pulpa de madera que comprende poner en contacto dicha pulpa de madera con una variante de CBH2.

25 **[0033]** En un décimo cuarto modo de realización es un método para convertir biomasa en azúcares que comprende poner en contacto dicha biomasa con una variante de CBH2.

30 **[0034]** En un modo de realización, la celulasa se deriva de un hongo, de bacterias o de Actinomiceto. En un aspecto, la celulasa se deriva de un hongo. En otro aspecto, el hongo es un hongo filamentoso. Se prefiere que el hongo filamentoso pertenezca a Euscomycete, en concreto, *Aspergillus spp.*, *Gliocladium spp.*, *Fusarium spp.*, *Acremonium spp.*, *Myceliophthora spp.*, *Verticillium spp.*, *Myrothecium spp.*, o *Penicillium spp.* En un aspecto adicional de este modo de realización, la celulasa es una celobiohidrolasa.

35 **[0035]** Otros objetivos, características y ventajas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. No obstante, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modos de realización preferidos de la invención, se proporcionan a modo de ilustración únicamente, puesto que para un experto en la materia resultarán evidentes varios cambios y modificaciones a partir de esta descripción detallada.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### **[0036]**

La Figura 1 es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la Cel6A (CBH2) natural de *H. jecorina*.

La Figura 2 es la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) de la CBH2 natural de *H. jecorina*.

40 Las Figuras de la 3A a la 3C muestran el alineamiento de aminoácidos de los miembros de la familia Cel6 para los cuales había estructuras de cristal disponibles. Las secuencias son: - CBH2 de *Humicola insolens*, CBH2 de *Acremonium*, CBH2 de *Agaricus*, CBH2 de *Fusarium oxysporum*, CBH2 de *Hypocrea koningii*, CBH2 de *Phanerochaete chrysosporum*, CBH2 de *Talaromyces emersonii*, CBH2 de *T. reesei* (es decir, CBH2 de *Hypocrea jecorina*, y la secuencia consenso. El alineamiento se ha realizado por Clustal W con una penalización de espacio de 10 utilizando el programa de *software* Vector NTI Suite.

45 La Figura 4 es el vector pRAX1. Este vector se basa en el plásmido pGAPT2 a excepción de que se insertó un fragmento HindIII de 5259 pb de la secuencia AMA1 del fragmento de ADN genómico de *Aspergillus nidulans* (Aleksenko y Clutterbuck, *Molecular Microbiology* 1996 19:565-574). Las bases de la 1 a la 1134 contienen el gen promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Las bases de la 3098 a la 3356 y de la 4950 a la 4971 contienen el terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Se insertó un gen pyrG de *Aspergillus nidulans* de la 3357 a la 4949 como marcador para la transformación fúngica. Existe un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) en el que se pueden insertar genes.

50 La Figura 5 es el esqueleto del vector pRAXdes2. Este vector se basa en el vector plasmídico pRAX1. Se ha insertado un casete Gateway en el vector pRAX1 (indicado por la flecha en el interior del plásmido circular). Este casete contiene las secuencias de recombinación attR1 y attR2 y los marcadores de

55

selección catH and ccdB. El vector se ha realizado de conformidad con el manual proporcionado en Gateway™ Cloning Technology: versión 1 páginas 34-38 y solo puede replicarse en *E. coli* DB3.1 de Invitrogen; en otros huéspedes de *E. coli* el gen ccdB es letal. En primer lugar, se realiza un fragmento de PCR con cebadores que contienen secuencias de recombinación attB1/2. Este fragmento se recombina con pDONR201 (comercialmente disponible de Invitrogen); este vector contiene secuencias de recombinación attP1/2 con catH y ccdB entre los sitios de recombinación. Las enzimas BP clonase de Invitrogen se utilizan para recombinar el fragmento de PCR en este vector denominado ENTRY, se pueden seleccionar los clones con el fragmento de PCR insertado a 50 µg/ml de kanamicina, puesto que los clones que expresan ccdB no sobreviven. Ahora las secuencias att están alteradas y se denominan attL1 y attL2. La segunda etapa es recombinar este clon con el vector pRAXdes2 (que contiene attR1 y attR2 con catH y ccdB entre los sitios de recombinación). Las enzimas LR clonase de Invitrogen se utilizan para recombinar la inserción del vector ENTRY en el vector de destino. Solo se seleccionan vectores pRAXCBH2 utilizando 100 µg/ml de ampicilina, puesto que el ccdB es letal y el vector ENTRY es sensible a la ampicilina. Mediante este método se prepara entonces el vector de expresión y se puede utilizar para transformar *A. niger*.

La Figura 6 proporciona una ilustración del vector pRAXdes2cbh2 que se utilizó para la expresión de los ácidos nucleicos que codificaban las variantes de CBH2 en *Aspergillus*. Se clonó en el vector un ácido nucleico que codificaba una variante u homólogo de enzima CBH2 mediante recombinación homóloga de las secuencias att.

La Figura 7 proporciona una ilustración del vector pENTRY-CBH2.

La Figura 8 es un gráfico de la liberación de azúcares dependiente de la dosis a partir de celulosa hinchada con ácido fosfórico por diferentes variantes. Las variantes muestran un amplio intervalo de actividad en este sustrato.

La Figura 9 es un gráfico de barras de la relación del azúcar total (medio) producido por una variante y el azúcar total (medio) producido por la CBH2 natural medido en PASC (celulosa hinchada con ácido fosfórico).

La Figura 10 es un gráfico que muestra la cantidad de azúcar liberada por cantidades distintas de enzima. La enzima natural se indica como FCA500.3 (rombos en blanco) y la variante es FCA543 (P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/S413Y) (cuadrados en blanco). El caldo de una cepa con la CBH2 delecionada sirvió como control.

La Figura 11 es un gráfico de barras de la relación del azúcar total (medio) producido por una variante y el azúcar total (medio) producido por la CBH2 natural medida en rastrojo de maíz pretratado. El valor mínimo de la escala del eje-y es 0,6, que representa el valor del azúcar total (medio) producido por la cepa con la CBH2 delecionada dividido por el azúcar total (medio) producido por la CBH2 natural en combinación con la cepa con la CBH2 delecionada. Un valor de 1 representa un nivel de actividad similar al de la natural.

La Figura 12 es un gráfico de un experimento en el curso del tiempo. Se muestra el azúcar total liberado de PASC por una molécula de CBH2 conforme pasa el tiempo a 53 °C. La variante se muestra como triángulos rellenos (▲); la natural se muestra como cuadrados en blanco (□).

La Figura 13 es un gráfico de un experimento en el curso del tiempo. Se muestra el azúcar total liberado de PASC por una molécula de CBH2 conforme pasa el tiempo a 65 °C. La variante se muestra como triángulos rellenos (▲); la natural se muestra como cuadrados en blanco (□).

La Figura 14 es un gráfico de un experimento en el curso del tiempo. Se muestra el azúcar total liberado de PASC por una molécula de CBH2 conforme pasa el tiempo a 75 °C. La variante se muestra como triángulos rellenos (▲); la natural se muestra como cuadrados en blanco (□).

La Figura 15 es un gráfico que representa el rendimiento específico de una mezcla de celulasa a 38 °C. La mezcla contiene el núcleo catalítico E1 de *Acidothermus cellulolyticus* y las celobiohidrolasas de tipo natural o las variantes. La natural se designa como 301, 500, que indica que se utilizaron la CBH1 natural (es decir, 301) y la CBH2 natural (es decir, 500). La variante se designa como 469, 543, que indica que se utilizaron la variante de CBH1 (es decir, 469) y la variante de CBH2 (es decir, 543).

La Figura 16 es un gráfico que representa el rendimiento específico de una mezcla de celulasa a 65 °C. La mezcla contiene el núcleo catalítico E1 de *Acidothermus cellulolyticus* y las celobiohidrolasas de tipo natural o las variantes. La natural se designa como 301, 500, que indica que se utilizaron la CBH1 natural (es decir, 301) y la CBH2 natural (es decir, 500). La variante se designa como 469, 543, que indica que se utilizaron la variante de CBH1 (es decir, 469) y la variante de CBH2 (es decir, 543).

La Figura 17 es un gráfico de los resultados del ensayo de conversión de sacarificación a pequeña escala a distintas temperaturas de la mezcla de variante de celulasa descrita anteriormente en la Figura 16.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0037]** A continuación se describirá con detalle la exposición únicamente a modo de referencia utilizando las siguientes definiciones y ejemplos.

**[0038]** 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 en la materia. Singleton, *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2D ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Markham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF*

*BIOLOGY*, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos utilizados. Aunque en la práctica o en el ensayo se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, se describen los métodos y los materiales preferidos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo, respectivamente. Se dirige a los profesionales en concreto a Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (Segunda edición), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989, y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1993, para definiciones y términos de la técnica. Ha de entenderse que la presente exposición no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos concretos descritos, puesto que estos pueden variar.

[0039] Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o modos de realización que se pueden tomar como referencia a la memoria en general. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de forma más completa en referencia a la memoria en general.

## I. DEFINICIONES

[0040] El término "polipéptido" como se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto formado por una sola cadena de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El término "proteína" como se utiliza en el presente documento puede ser sinónimo del término "polipéptido".

[0041] "Variante" significa una proteína que se deriva de una proteína precursora (por ejemplo, la proteína nativa) mediante la adición de uno o más aminoácidos a cualquiera de los extremos C- y N-terminal o a ambos, la sustitución de uno o más aminoácidos en un sitio o en un conjunto de sitios diferentes en la secuencia de aminoácidos, o la delección de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos o en ambos extremos de la proteína o en uno o más sitios en la secuencia de aminoácidos. La preparación de una variante de enzima se consigue preferiblemente mediante la modificación una secuencia de ADN que codifica la proteína nativa, la transformación de la secuencia de ADN modificada en un huésped adecuado y la expresión de la secuencia de ADN modificada para formar la variante de enzima. La variante de enzima CBH2 incluye péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos alteradas en comparación con una secuencia de aminoácidos de enzima precursora en la que la variante de enzima CBH2 retiene la naturaleza celulolítica característica de la enzima precursora, pero puede tener propiedades alteradas en algunos aspectos específicos. Por ejemplo, una variante de enzima de CBH2 puede tener un pH óptimo aumentado o temperatura aumentada o estabilidad oxidativa, pero mantendrá su actividad celulolítica característica. Se contempla que las variantes se pueden derivar de un fragmento de ADN que codifica una enzima de celulasa CBH2 donde se conserva la actividad funcional de la variante de celulasa expresada. Por ejemplo, un fragmento de ADN que codifica una celulasa puede incluir además una secuencia de ADN o una parte de la misma que codifica una bisagra o enlazador unido a la secuencia de ADN de celulasa en cualquiera de los extremos 5' o 3' donde se conserva la actividad funcional del dominio de celulasa codificado. Los términos variante y derivado se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

[0042] Los "residuos equivalentes" también se pueden definir determinando la homología al nivel de la estructura terciaria para una celulasa precursora cuya estructura terciaria se ha determinado mediante cristalografía de rayos X. Los residuos equivalentes se definen como aquellos para los que las coordenadas atómicas de dos o más átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido concreto de una celulasa y CBH2 de *Hypocrea jecorina* (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están dentro de 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm después del alineamiento. El alineamiento se consigue después de haber orientado y posicionado el mejor modelo para proporcionar el máximo solapamiento de coordenadas atómicas de átomos de proteína que no son hidrógeno de la celulasa en cuestión con respecto a la CBH2 de *H. jecorina*. El mejor modelo es el modelo cristalográfico que proporciona el factor R más bajo para datos de difracción experimental a la resolución más alta disponible.

$$R \text{ factor} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

[0043] Los residuos equivalentes que son funcionalmente análogos a un residuo específico de CBH2 de *H. jecorina* se definen como aquellos aminoácidos de una celulasa que pueden adoptar una conformación de tal manera que alteran, modifican o contribuyen a la estructura de la proteína, la unión del sustrato o catálisis de una manera definida y atribuida a un residuo específico de la CBH2 *H. jecorina*. Además, son aquellos residuos de la celulasa (para los que se ha obtenido una estructura terciaria mediante cristalografía de rayos-x) que ocupan una posición análoga en la medida en que, aunque los átomos de la cadena principal del residuo dado pueden no cumplir los criterios de equivalencia con respecto a la ocupación de una posición homóloga, las coordenadas atómicas de al menos dos de los átomos de cadena lateral del residuo se encuentran en 0,13 nm de los correspondientes átomos de la cadena lateral de CBH2 de *H. jecorina*. La estructura cristalina de CBH2 de *H. jecorina* se muestra en Zou *et al.* (1999) (Ref. 5, *supra*).

- 5 **[0044]** El término “molécula de ácido nucleico” incluye moléculas de ARN, ADN y ADNc. Se entenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, se pueden producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican una proteína determinada, tal como CBH2 y/o variantes de la misma. La presente exposición contempla todas las posibles variantes de secuencias de nucleótidos, que codifiquen la variante de CBH2, las cuales son todas posibles debido a la degeneración del código genético.
- 10 **[0045]** Un constructo o secuencia de ácido nucleico “heterólogo” tiene una parte de la secuencia que no es nativa a la célula en la que se expresa. Heterólogo, con respecto a una secuencia de control, se refiere a una secuencia de control (es decir, promotor o potenciador) que no funciona en la naturaleza para regular el mismo gen cuya expresión está regulando actualmente. En general, las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas no son endógenas a la célula o parte del genoma en el que están presentes, y se han añadido a la célula mediante infección, transfección, transformación, microinyección, electroporación o similar. Un constructo de ácido nucleico “heterólogo” puede contener una combinación de secuencia de control/secuencia de codificación de ADN que sea la misma que, o diferente a una combinación de secuencia de control/secuencia de codificación de ADN encontrada en la célula nativa.
- 15 **[0046]** Como se utiliza en el presente documento, el término “vector” se refiere a un constructo de ácido nucleico diseñado para la transferencia entre células huésped diferentes. Un “vector de expresión” se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula extraña. Muchos vectores de expresión procariontes y eucariotes están comercialmente disponibles. La selección de vectores de expresión adecuados está dentro del conocimiento de los expertos en la materia.
- 20 **[0047]** Por consiguiente, un “casete de expresión” o “vector de expresión” es un constructo de ácido nucleico generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico concreto en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plastidial, virus, o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, la parte del casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre  
25 otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico para ser transcrita y un promotor.
- [0048]** Como se utiliza en el presente documento, el término “plásmido” se refiere a un constructo de ADN bicatenario circular utilizado como un vector de clonación, y que forma un elemento genético autorreplicante extracromosómico en muchas bacterias y algunos eucariotes.
- 30 **[0049]** Como se utiliza en el presente documento, el término “secuencia de nucleótidos que codifica un marcador seleccionable” se refiere a una secuencia de nucleótidos que es capaz de expresión en células y donde la expresión del marcador seleccionable confiere a las células que contienen el gen expresado la capacidad de crecer en presencia de un agente selectivo correspondiente, o bajo condiciones de crecimiento selectivo correspondientes.
- 35 **[0050]** Como se utiliza en el presente documento, el término “promotor” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de un gen secuencia abajo. El promotor será en general adecuado para la célula huésped en la que se está expresando el gen diana. El promotor junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción o la traducción (también denominadas “secuencias de control”) son necesarios para expresar un gen determinado. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción incluyen, pero sin carácter limitativo, secuencias promotoras, sitios de unión al  
40 ribosoma, secuencias de inicio y de detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras.
- 45 **[0051]** “Gen quimérico” o “constructo de ácido nucleico heterólogo”, como se define en el presente documento, se refiere a un gen no nativo (es decir, uno que se ha introducido en un huésped) que puede estar compuesto por partes de genes diferentes, incluyendo elementos reguladores. Un constructo de gen quimérico para la transformación de una célula huésped se compone normalmente de una región reguladora de la transcripción (promotor) operativamente unida a una secuencia de codificación de proteínas heterólogas, o en un gen quimérico marcador seleccionable, a un gen marcador seleccionable que codifica una proteína que confiere, por ejemplo, resistencia a los antibióticos a las células transformadas. Un gen quimérico típico, para la transformación en una célula huésped, incluye una región reguladora de la transcripción que es constitutiva o  
50 inducible, una secuencia de codificación de proteína y una secuencia de terminación. Un constructo de gen quimérico puede incluir también una segunda secuencia de ADN que codifica un péptido señal si se desea la secreción de la proteína diana.
- 55 **[0052]** Un ácido nucleico está “operativamente unido” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN que codifica un líder secretor está operativamente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si se posiciona de manera que facilite la traducción. En general, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en el marco de lectura.

No obstante, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los ligadores, cebadores o adaptadores oligonucleótidos sintéticos para PCR se utilizan de conformidad con la práctica convencional.

5 **[0053]** Como se utiliza en el presente documento, el término "gen" significa el segmento de ADN que participa en la producción de una cadena de polipéptidos, que puede o no incluir regiones precedentes y posteriores a la región de codificación, por ejemplo, secuencias 5' no traducidas (5' UTR) o secuencias "líder" y secuencias 3' UTR o secuencias "tráiler", así como secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

10 **[0054]** En general, las moléculas de ácido nucleico que codifican la variante de CBH2 se hibridarán, bajo condiciones de moderada a alta restricción a la secuencia natural proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 1. No obstante, en algunos casos se emplea una secuencia de nucleótidos que codifica CBH2 que posee una utilización de codón sustancialmente diferente, mientras que la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos que codifica CBH2 tiene la secuencia de aminoácidos igual o sustancialmente igual que la de la proteína nativa. Por ejemplo, la secuencia de codificación se puede modificar para facilitar la expresión más rápida de CBH2 en un sistema concreto de expresión procariota o eucariota, de conformidad con la frecuencia con la que el huésped utiliza un codón concreto. Te'o, *et al.* (FEMS Microbiology Letters 190:13-19,2000), por ejemplo, describe la optimización de genes para la expresión en hongos filamentosos.

15 **[0055]** Una secuencia de ácido nucleico se considera "selectivamente hibridable" a una secuencia de ácido nucleico de referencia si las dos secuencias se hibridan específicamente entre sí bajo condiciones de lavado y de hibridación de moderada a alta restricción. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (Tf) de la sonda o del complejo de unión a ácido nucleico. Por ejemplo, la "restricción máxima" ocurre normalmente a aproximadamente Tf-5 °C (5 °C por debajo de la Tf de la sonda); la "restricción alta" a aproximadamente 5 °C - 10 °C por debajo de la Tf; la "restricción moderada" o "intermedia" a aproximadamente 10 °C - 20 °C por debajo de la Tf de la sonda; y la "restricción baja" a aproximadamente 20 °C - 25 °C por debajo de la Tf. Funcionalmente, las condiciones de restricción máxima se pueden utilizar para identificar secuencias que tienen identidad estricta o identidad casi estricta con la sonda de hibridación; mientras que las condiciones de restricción alta se utilizan para identificar secuencias que tienen aproximadamente 80 % o más de identidad de secuencia con la sonda.

20 **[0056]** Las condiciones de hibridación de moderada y alta restricción se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, 1989, Capítulos 9 y 11, y en Ausubel, F.M., *et al.*, 1993). Un ejemplo de condiciones de restricción alta incluye hibridación a aproximadamente 42 °C en formamida al 50 %, 5X de SSC, 5X de Denhardt's solution, SDS al 0,5 % y 100 µg/ml de ADN portador desnaturalizado seguido del lavado dos veces en 2X de SSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente y dos veces adicionales en 0,1 X de SSC y SDS al 0,5 % a 42 °C.

35 **[0057]** Como se utiliza en el presente documento, el término "recombinante", incluye referencia a una célula o vector que se ha modificado por la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. De esta manera, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en forma idéntica en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otro modo, se subexpresan o no se expresan en absoluto como resultado de intervención humana deliberada.

40 **[0058]** Como se utilizan en el presente documento, los términos "transformada", "establemente transformada" o "transgénica" con referencia a una célula significan que la célula tiene una secuencia de ácido nucleico no nativa (heteróloga) integrada en su genoma o como un plásmido episomal que se mantiene a través de múltiples generaciones.

45 **[0059]** Como se utiliza en el presente documento, el término "expresión" se refiere al proceso por el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

50 **[0060]** El término "introducido", en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula significa "transfección" o "transformación" o "transducción" e incluye referencia a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota en la que la secuencia de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo o expresarse transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado).

55 **[0061]** Se deduce que el término "expresión de CBH2" se refiere a la transcripción y traducción del gen *cbh2* o variantes del mismo, cuyos productos incluyen ARN precursor, ARNm, polipéptido, polipéptidos procesados tras la traducción y derivados de los mismos, que incluyen CBH2 de especies relacionadas, tales como *Trichoderma koningii*, *Hypocrea jecorina* (también conocida como *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*) e *Hypocrea schweinitzii*. A modo de ejemplo, los ensayos para la expresión de CBH2 incluyen transferencia Western para proteína CBH2, análisis de transferencia Northern y ensayos de reacción en

cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) para ARNm de *cbh2*, y ensayos de celulosa hinchada con ácido fosfórico y PAHBAH como se describen en los siguientes: (a) PASC: (Karlsson, J. et al. (2001), *Eur. J. Biochem*, 268, 498-6507, Wood, T. (1988) en *Methods in Enzymology*, Vol. 160. *Biomass Part a Cellulose and Hemicellulose* (Wood, W. & Kellog, S. Eds.), pp. 19-25, Academic Press, San Diego, CA, USA) y (b) PAHBAH: (Lever, M. (1972) *Analytical Biochemistry*, 47, 273, Blakeney, A.B. & Mutton, L.L. (1980) *Journal of Science of Food and Agriculture*, 31, 889, Henry, R.J. (1984) *Journal of the Institute of Brewing*, 90, 37).

**[0062]** El término "corte y empalme alternativo" se refiere al proceso por el cual se generan múltiples isoformas de polipéptido a partir de un solo gen, e implica el corte y empalme junto de exones no consecutivos durante el procesamiento de algunas, pero no todas, las transcripciones del gen. De esta manera, se puede conectar un exon concreto a cualquiera de los varios exones alternativos para formar ARN mensajeros. Los ARNm cortados y empalmados de manera alternativa producen polipéptidos ("variantes de corte y empalme") en los que algunas partes son comunes, mientras que otras partes son diferentes.

**[0063]** El término "secuencia señal" se refiere a una secuencia de aminoácidos en la parte N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la forma madura de la proteína fuera de la célula. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia señal, que se escinde durante el proceso de secreción.

**[0064]** Por el término "célula huésped" se entiende una célula que contiene un vector y soporta la replicación y/o la transcripción o la transcripción y la traducción (expresión) del constructo de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas, tales como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levaduras, plantas, insectos, anfibios o mamíferos. En general, las células huésped son hongos filamentosos.

**[0065]** El término "hongos filamentosos" significa cualquiera y todos los hongos filamentosos reconocidos por los expertos en la materia. Se selecciona un hongo preferido del grupo consistente en *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Humicola*, *Neurospora*, o formas sexuales alternativas de los mismos tales como *Emericella*, *Hypocrea*. Ahora se ha demostrado que el hongo industrial asexual *Trichoderma reesei* es un derivado clónico del ascomiceto *Hypocrea jecorina*. Véase Kuhls *et al.*, PNAS (1996) 93:7755-7760.

**[0066]** El término "celooligosacárido" se refiere a grupos oligosacáridos que contienen de 2 a 8 unidades de glucosa y tienen enlaces  $\beta$ -1,4, por ejemplo, celobiosa.

**[0067]** El término "celulasa" se refiere a una categoría de enzimas capaces de hidrolizar polímeros de celulosa a oligómeros de celooligosacáridos más cortos, celobiosa y/o glucosa. Se han obtenido numerosos ejemplos de celulasas, tales como exoglucanasas, exocelobiohidrolasas, endoglucanasas y glucosidasas, a partir de organismos celulolíticos, incluyendo particularmente hongos, plantas y bacterias.

**[0068]** La CBH2 de *Hypocrea jecorina* es un miembro de la Familia 6 de glicosil hidrolasa (por tanto, Cel6) y, específicamente, fue el primer miembro de esa familia identificado en *Hypocrea jecorina* (por tanto, Cel6A). La Familia 6 de glicosil hidrolasa contiene tanto endoglucanasas como celobiohidrolasas/exoglucanasas, y esa CBH2 es esta última. De esta manera, las expresiones CBH2, proteína de tipo CBH2 y celobiohidrolasas Cel6 se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

**[0069]** El término "dominio de unión a celulosa" como se utiliza en el presente documento se refiere a la parte de la secuencia de aminoácidos de una celulasa o de una región de la enzima que interviene en la actividad de unión a celulosa de una celulasa o un derivado de la misma. Los dominios de unión a celulosa generalmente funcionan uniendo de manera no covalente la celulasa a la celulosa, un derivado de celulosa u otro polisacárido equivalente de la misma. Los dominios de unión a celulosa permiten o facilitan la hidrólisis de fibras de celulosa por la región de núcleo catalítico estructuralmente distinto y funcionan normalmente independientes del núcleo catalítico. De esta manera, un dominio de unión a celulosa no poseerá la actividad hidrolítica significativa atribuible a un núcleo catalítico. Dicho de otro modo, un dominio de unión a celulosa es un elemento estructural de la estructura terciaria de la proteína enzimática de celulasa que es distinto del elemento estructural que posee actividad catalítica. Dominio de unión a celulosa y módulo de unión a celulosa se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

**[0070]** Como se utiliza en el presente documento, el término "surfactante" se refiere a cualquier compuesto generalmente reconocido en la técnica por tener cualidades activas de superficie. De esta manera, por ejemplo, los surfactantes comprenden surfactantes aniónicos, catiónicos y no iónicos, tales como los que se encuentran habitualmente en los detergentes. Los surfactantes aniónicos incluyen alquilbenzenosulfonatos lineales o ramificados; sulfatos de éter de alquilo o alqueno que tienen grupos alquilo o alqueno lineales o ramificados; sulfatos de alquilo o alqueno; olefinsulfonatos; y alcanosulfonatos. Los surfactantes anfólicos incluyen sulfonatos de sal de amonio cuaternario y surfactantes anfólicos de tipo betaína. Dichos surfactantes anfólicos tienen tanto grupos de carga positiva como negativa en la misma molécula. Los surfactantes no iónicos pueden comprender éteres de polioxialquilo, así como alcanolamidas de ácidos grasos superiores o aductos de óxido de alquilo del mismo, monoésteres de glicerina de ácidos grasos, y similares.

**[0071]** Como se utiliza en el presente documento, el término “tejido que contiene celulosa” se refiere a cualquier tejido cosido o no cosido, hilo o fibra de algodón o no de algodón que contienen celulosa o de algodón o no de algodón que contienen mezclas de celulosa, incluyendo celulósicos naturales y celulósicos sintéticos (tales como yute, lino, ramio, rayón y licel).

5 **[0072]** Como se utiliza en el presente documento, el término “tejido que contiene algodón” se refiere a tejidos cosidos o no cosidos, hilos o fibras de algodón puro o de mezclas de algodón, incluyendo tejidos de algodón tejido, prendas de punto de algodón, vaqueros de algodón, hilos de algodón, algodón en bruto y similares.

10 **[0073]** Como se utiliza en el presente documento, el término “composición para lavado a la piedra” se refiere a una formulación para utilizarse en tejidos que contienen celulosa lavados a la piedra. Las composiciones para lavado a la piedra se utilizan para modificar tejidos que contienen celulosa antes de su venta, es decir, durante el proceso de fabricación. Por el contrario, las composiciones detergentes están destinadas a la limpieza de ropa sucia y no se utilizan durante el proceso de fabricación.

15 **[0074]** Como se utiliza en el presente documento, el término “composición detergente” se refiere a una mezcla que está destinada a utilizarse en un medio de lavado para el lavado de tejidos sucios que contienen celulosa. Tales composiciones pueden incluir, además de celulasas y surfactantes, enzimas hidrolíticas adicionales, mejoradores, agentes blanqueadores, activadores de blanqueo, agentes azulantes y tintes fluorescentes, inhibidores del apelmazamiento, agentes enmascarantes, activadores de celulasa, antioxidantes y solubilizantes.

20 **[0075]** Como se utiliza en el presente documento, el término “reducción o eliminación en la expresión del gen *cbh2*” significa que el gen *cbh2* ha sido delecionado del genoma y, por tanto, no puede ser expresado por el microorganismo huésped recombinante; o que el gen *cbh2* o la transcripción ha sido modificado de tal manera que el microorganismo huésped no produce una enzima CBH2 funcional.

**[0076]** El término “variante del *gen cbh2*” o “variante de CBH2” significa, respectivamente, que la secuencia de ácido nucleico del *gen cbh2* de *H. jecorina* se ha alterado mediante la eliminación, adición y/o manipulación de la secuencia de codificación o que la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada se ha modificado.

25 **[0077]** Como se utiliza en el presente documento, el término “purificar” generalmente se refiere a someter ácidos nucleicos transgénicos o células que contienen proteínas a purificación bioquímica y/o cromatografía en columna.

30 **[0078]** Como se utiliza en el presente documento, los términos “activo” o “biológicamente activo” se refieren a una actividad biológica asociada a una determinada proteína y se utilizan indistintamente en el presente documento. Por ejemplo, la actividad enzimática asociada a una proteasa es la proteólisis y, por tanto, una proteasa activa tiene actividad proteolítica. Se deduce que la actividad biológica de una proteína determinada se refiere a cualquier actividad biológica que los expertos en la materia atribuyen normalmente a esta proteína.

35 **[0079]** Como se utiliza en el presente documento, el término “enriquecida” significa que la CBH2 se encuentra en una concentración que es mayor en relación con la concentración de CBH2 encontrada en una composición de celulasa fúngica natural, o de origen natural. Los términos enriquecida, elevada y mejorada se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

40 **[0080]** Una composición de celulasa fúngica natural es una producida por una fuente fúngica de origen natural y que comprende uno o más componentes BGL, CBH y EG, donde cada uno de estos componentes se encuentra en la proporción producida por la fuente fúngica. De esta manera, una composición de CBH enriquecida tendría CBH en una proporción alterada, donde la proporción de CBH con respecto a otros componentes de celulasa (es decir EG, beta-glucosidasas y otras endoglucanasas) es elevada. Esta proporción se puede incrementar ya sea aumentando la CBH o disminuyendo (o eliminando) al menos algún otro componente mediante cualquier medio conocido en la técnica.

45 **[0081]** El término “aislado” o “purificado” como se utiliza en el presente documento se refiere a un ácido nucleico o aminoácido que se elimina de al menos un componente con el cual está asociado de manera natural.

50 **[0082]** De esta manera, como ilustración, un sistema de celulasas de origen natural se puede purificar en componentes sustancialmente puros mediante técnicas de separación reconocidas publicadas en la literatura, incluyendo cromatografía de intercambio iónico a un pH adecuado, cromatografía de afinidad, exclusión de tamaño y similares. Por ejemplo, en la cromatografía de intercambio iónico (normalmente cromatografía de intercambio aniónico) es posible separar los componentes de celulasa mediante elución con un gradiente de pH, o un gradiente de sal, o ambos, un gradiente de pH y de sal. La CBH purificada se puede añadir entonces a la solución enzimática dando lugar a una solución de CBH enriquecida. También es posible elevar la cantidad de CBH producida mediante un microbio utilizando métodos de genética molecular para sobreexpresar el gen que codifica CBH, posiblemente en conjunción con la deleción de uno o más genes que codifican otras celulasas.

55 **[0083]** Las celulasas fúngicas pueden contener más de un componente CBH. Los componentes diferentes generalmente tienen puntos isoeléctricos diferentes que permiten su separación mediante cromatografía de

intercambio iónico y similares. En una solución enzimática se puede emplear un único componente CBH o una combinación de componentes de CBH.

**[0084]** Cuando se emplea en soluciones enzimáticas, el homólogo o variante de componente CBH2 se añade generalmente en una cantidad suficiente para permitir el índice más alto de liberación de azúcares solubles de la biomasa. La cantidad de homólogo o variante de componente CBH2 añadida depende del tipo de biomasa que se sacarifica, que puede determinarse fácilmente por el experto en la materia, cuando se utiliza, el porcentaje en peso del homólogo o la variante de componente CBH2 presente en la composición de celulosa es de preferiblemente entre 1 y 100 con ejemplos ilustrativos siendo aproximadamente 1, preferiblemente aproximadamente 5 preferiblemente aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 15, o preferiblemente aproximadamente 20 por ciento en peso a preferiblemente aproximadamente 25, preferiblemente aproximadamente 30, preferiblemente aproximadamente 35, preferiblemente aproximadamente 40, preferiblemente aproximadamente 45 o preferiblemente aproximadamente 50 por ciento en peso. Además, los intervalos preferidos pueden ser aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 45 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 65 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 70 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 80 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 85 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 95 por ciento en peso. No obstante, cuando se utiliza, el porcentaje en peso del homólogo o variante de componente CBH2 en relación con cualquier componente de tipo EG presente en la composición de celulosa es de preferiblemente aproximadamente 1, preferiblemente aproximadamente 5, preferiblemente aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 15, o preferiblemente aproximadamente 20 por ciento en peso a preferiblemente aproximadamente 25, preferiblemente aproximadamente 30, preferiblemente aproximadamente 35, preferiblemente aproximadamente 40, preferiblemente aproximadamente 45 o preferiblemente aproximadamente 50 por ciento en peso. Además, los intervalos preferidos pueden ser aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 45 por ciento en peso, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 45 por ciento en peso, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 por ciento en peso, de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 por ciento en peso.

## II. ORGANISMOS HUÉSPED

**[0085]** Los hongos filamentosos incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota. Los hongos filamentosos se caracterizan por tener un micelio vegetativo que tiene una pared celular compuesta por quitina, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos, con crecimiento vegetativo mediante elongación hifal y catabolismo de carbono que es obligadamente aeróbico.

**[0086]** La célula parental de hongo filamentoso puede ser una célula de una especie de, pero sin carácter limitativo, *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma virile*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*; *Penicillium* sp.; *Humicola* sp., incluyendo *Humicola insolens* y *Humicola grisea*; *Chrysosporium* sp., incluyendo *C. lucknowense*; *Gliocladium* sp.; *Aspergillus* sp.; *Fusarium* sp., *Neurospora* sp., *Hypocrea* sp., y *Emericella* sp. Como se utiliza en el presente documento, el término "*Trichoderma*" o

"*Trichoderma sp.*" se refiere a cualquier cepa fúngica que ha sido previamente clasificada como *Trichoderma* o que está actualmente clasificada como *Trichoderma*.

[0087] En un modo de realización preferido, la célula parental de hongo filamentoso es una célula de *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus aculeatus*, o *Aspergillus nidulans*.

5 [0088] En otro modo de realización preferido, la célula parental de hongo filamentoso es una célula de *Trichoderma reesei*.

### III. CELULASAS

10 [0089] Las celulasas se conocen en la técnica como enzimas que hidrolizan celulosa (enlaces beta-1,4-glucano o beta D-glucosídicos) dando lugar a la formación de glucosa, celobiosa, celooligosacáridos, y similares. Como se ha descrito anteriormente, las celulasas se han dividido tradicionalmente en tres clases principales: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) ("EG"), exoglucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) ("CBH") y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) ("BG"). (Knowles *et al.*, TIBTECH 5, 255-261, 1987; Schulein, 1988).

15 [0090] Algunos hongos producen sistemas de celulasas completos que incluyen exocelobiohidrolasas o celulasas de tipo CBH, endoglucanasas o celulasas de tipo EG y beta-glucosidasas o celulasas de tipo BG (Schulein, 1988). No obstante, a veces estos sistemas carecen de celulasas de tipo CBH y las celulasas bacterianas también incluyen normalmente pocas o ninguna celulosa de tipo CBH. Además, se ha demostrado que los componentes EG y los componentes CBH interactúan sinérgicamente para degradar celulosa de manera más eficiente. Véase, por ejemplo, Wood, 1985. Los componentes diferentes, es decir, las diversas endoglucanasas y exocelobiohidrolasas en un sistema de celulasas completo o multicomponente, generalmente  
20 tienen propiedades diferentes, tales como punto isoeléctrico, peso molecular, grado de glicosilación, especificidad de sustrato y patrones de acción enzimática.

[0091] Se cree que las celulasas de tipo endoglucanasa hidrolizan los enlaces internos beta-1,4-glucosídicos en regiones de baja cristalinidad de la celulosa y que las celulasas de tipo exocelobiohidrolasa hidrolizan la celobiosa a partir del extremo reductor o no reductor de la celulosa. Se deduce que la acción de los componentes  
25 de endoglucanasa pueden facilitar en gran medida la acción de las exocelobiohidrolasas mediante la creación de nuevos extremos de cadena que son reconocidos por los componentes de exocelobiohidrolasa. Además, se ha demostrado que las celulasas de tipo beta-glucosidasa catalizan la hidrólisis de alquil y/o aril  $\beta$ -D-glucósidos, tales como metil  $\beta$ -D-glucósido y p-nitrofenil glucósido, así como glicósidos que contienen únicamente residuos de carbohidratos, tales como celobiosa. Esto produce glucosa como el único producto para el microorganismo y reduce o elimina la celobiosa que inhibe las celobiohidrolasas y las endoglucanasas.  
30

[0092] Las celulasas también encuentran una serie de usos en composiciones detergentes, incluyendo mejorar la capacidad de limpieza, como un agente suavizante y mejorar el tacto de los tejidos de algodón (Hemmpel, *ITB Dyeing/Printing/Finishing* 3:5-14, 1991; Tyndall, *Textile Chemist and Colorist* 24:23-26, 1992; Kumar *et al.*, *Textile Chemist and Colorist*, 29:37-42, 1997). Las propiedades suavizantes y de restauración de color de la celulosa se han atribuido a los componentes de endoglucanasa alcalina en composiciones de celulosa, como lo demuestran  
35 las patentes estadounidenses n.º 5.648.263, 5.691.178, y 5.776.757, que describen que las composiciones detergentes que contienen una composición de celulosa enriquecida en un componente de endoglucanasa alcalina especificado imparten restauración de color y suavizado mejorado a las prendas tratadas en comparación con las composiciones de celulosa no enriquecidas en dicho componente. Además, se ha demostrado que la utilización de dichos componentes de endoglucanasa alcalina en composiciones detergentes complementa los requisitos de pH de la composición detergente (por ejemplo, exhibiendo actividad máxima en un pH alcalino de 7,5 a 10, como se describe en las patentes estadounidenses n.º 5.648.263, 5.691.178, y 5.776.757).  
40

[0093] También se ha demostrado que las composiciones de celulosa degradan tejidos que contienen algodón, dando lugar a una pérdida de resistencia reducida en el tejido (patente estadounidense n.º 4.822.516), contribuyendo a la retención a utilizar composiciones de celulosa en aplicaciones detergentes comerciales. Se ha sugerido que las composiciones de celulosa que comprenden componentes de endoglucanasa presentan una pérdida de resistencia reducida para tejidos que contienen algodón en comparación con las composiciones que comprenden un sistema de celulasas completo.  
45

[0094] También se ha demostrado que las celulasas son útiles en la degradación de biomasa de celulosa en etanol (donde la celulosa degrada celulosa en glucosa y levadura u otros microbios y además fermenta la glucosa en etanol), en el tratamiento de pulpa mecánica (Pere *et al.*, *In Proc. Tappi Pulping Conf.*, Nashville, TN, 27-31, pp. 693-696, 1996), para su utilización como aditivo para alimentación animal (WO 91/04673) y en la molienda en húmedo de grano.  
50

[0095] La mayoría de CBH y EG tiene una estructura multidominio que consiste en un dominio central separado de un dominio de unión a celulosa (CBD, por sus siglas en inglés) mediante un péptido de enlace (Suurnakki *et al.*, 2000). El dominio central contiene el sitio activo mientras que el CBD interacciona con la celulosa uniendo la  
55

enzima al mismo (van Tilbeurgh *et al.*, *FEBS Lett.* 204:223-227, 1986; Tomme *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 170:575-581, 1988). Los CBD son particularmente importantes en la hidrólisis de la celulosa cristalina. Se ha demostrado que la capacidad de las celobiohidrolasas para degradar la celulosa cristalina disminuye claramente cuando el CBD está ausente (Linder y Teeri, *J. Biotechnol.* 57:15-28, 1997). No obstante, la función exacta y el mecanismo de acción de los CBD siguen siendo un tema de especulación. Se ha sugerido que el CBD mejora la actividad enzimática simplemente incrementando la concentración de enzima efectiva en la superficie de celulosa (Stahlberg *et al.*, *Bio/Technol.* 9:286-290, 1991), y/o aflojando cadenas de celulosa simples de la superficie de celulosa (Tormo *et al.*, *EMBO J.* vol. 15, n.º 21, pp. 5739-5751, 1996). La mayoría de estudios sobre los efectos de los dominios de celulasa en sustratos diferentes se han llevado a cabo con proteínas centrales de celobiohidrolasas, puesto que sus proteínas centrales se pueden producir fácilmente mediante proteólisis limitada con papaína (Tomme *et al.*, 1988). Se han descrito numerosas celulasas en la literatura científica, ejemplos de las cuales incluyen: de *Trichoderma reesei*: Shoemaker, S. *et al.*, *Bio/Technology*, 1:691-696, 1983, que describe CBH1; Teeri, T. *et al.*, *Gene*, 51:43-52, 1987, que describe CBH2. También se han descrito celulasas de especies distintas a *Trichoderma*, por ejemplo, Ooi *et al.*, *Nucleic Acids Research*, vol. 18, n.º 19, 1990, que describe la secuencia de ADNc que codifica la endoglucanasa F1-CMC producida por *Aspergillus aculeatus*; Kawaguchi T *et al.*, *Gene* 173(2):287-8, 1996, que describe la clonación y la secuenciación del ADNc que codifica la beta-glucosidasa 1 de *Aspergillus aculeatus*; Sakamoto *et al.*, *Curr. Genet.* 27:435-439, 1995, que describe la secuencia de ADNc que codifica la endoglucanasa CMCCase-1 de *Aspergillus kawachii* IFO 4308; Saarihahti *et al.*, *Gene* 90:9-14, 1990, que describe una endoglucanasa de *Erwinia carotovora*; Spilliaert R, *et al.*, *Eur J Biochem.* 224(3):923-30, 1994, que describe la clonación y la secuenciación de bglA, que codifica una beta-glucanasa termoestable a partir de *Rhodothermus marinus*; y Halldorsdottir S *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 49(3):277-84, 1998, que describe la clonación, la secuenciación y la sobreexpresión de un gen de *Rhodothermus marinus* que codifica una celulasa termoestable de la familia 12 de glicosil hidrolasa. No obstante, todavía resulta necesaria la identificación y caracterización de nuevas celulasas, con propiedades mejoradas, tales como rendimiento mejorado bajo condiciones de estrés térmico o en presencia de surfactantes, actividad específica aumentada, patrón de escisión de sustrato alterado, y/o alto nivel de expresión *in vitro*.

[0096] El desarrollo de nuevas y mejoradas composiciones de celulasa que comprenden cantidades diversas de celulasas de tipo CBH, de tipo EG y de tipo BG es de interés para utilizarse: (1) en composiciones detergentes que presentan capacidad de limpieza mejorada, funcionan como un agente suavizante y/o mejoran el tacto de los tejidos de algodón (por ejemplo, "lavado a la piedra" o "biopulido"); (2) en composiciones para degradar pulpa de madera u otra biomasa en azúcares (por ejemplo, para la producción de bioetanol); y/o (3) en composiciones para pienso.

#### IV. BIOLOGÍA MOLECULAR

[0097] Un modo de realización proporciona la expresión de variantes de genes *cbh2* bajo el control de un promotor funcional en un hongo filamentoso. Por lo tanto, esta descripción se basa en técnicas rutinarias en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos de uso generales incluyen Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994)).

#### Métodos para la identificación de genes *cbh2* homólogos

[0098] La secuencia de ácido nucleico para la CBH2 de *H. jecorina* natural se muestra en la Figura 1. Un aspecto abarca una molécula de ácido nucleico que codifica un homólogo de CBH2 descrito en el presente documento. El ácido nucleico puede ser una molécula de ADN.

[0099] Las técnicas que se pueden utilizar para aislar secuencias de ADN que codifican CBH2 se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin carácter limitativo, ADNc y/o cribado de la librería genómica con una sonda de ADN homóloga y cribado de expresión con ensayos de actividad o anticuerpos contra CBH2. Cualquiera de estos métodos se pueden encontrar en Sambrook, *et al.* o en *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, F. Ausubel, *et al.*, ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1987) ("Ausubel").

#### Métodos de mutación de secuencias de ácido nucleico de *cbh2*

[0100] Se contempla cualquier método conocido en la técnica que pueda introducir mutaciones.

[0101] La presente descripción se refiere a la expresión, la purificación y/o el aislamiento y la utilización de variante de CBH2. Estas enzimas se preparan preferiblemente mediante métodos recombinantes que utilizan el gen *cbh2* de *H. jecorina*. El caldo de fermentación se puede utilizar con o sin purificación.

[0102] Tras el aislamiento y la clonación del gen *cbh2* de *H. jecorina*, se utilizan otros métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido, para realizar las sustituciones, adiciones o deleciones que corresponden a aminoácidos sustituidos en la variante de CBH2 expresada. De nuevo, la mutagénesis de sitio dirigido y otros métodos para incorporar cambios de aminoácidos en proteínas expresadas a nivel de ADN se pueden encontrar en Sambrook, *et al.* y Ausubel, *et al.*

[0103] El ADN que codifica una variante de secuencia de aminoácidos de la CBH2 de *H. jecorina* se prepara mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin carácter limitativo, la preparación mediante mutagénesis de sitio dirigido (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR y mutagénesis por inserción de un casete de un ADN preparado anteriormente que codifica la CBH2 de *H. jecorina*.

[0104] La mutagénesis de sitio dirigido es un método preferido para preparar variantes de sustitución. Esta técnica se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Carter *et al. Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443 (1985) y Kunkel *et al., Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 82:488 (1987)). En resumen, al llevar a cabo la mutagénesis de sitio dirigido del ADN, el ADN inicial se altera hibridando en primer lugar un oligonucleótido que codifica la mutación deseada en una cadena simple de dicho ADN inicial. Después de la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena completa, utilizando el oligonucleótido hibridado como cebador, y utilizando la cadena simple del ADN inicial como plantilla. De esta manera, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora en el ADN bicatenario resultante.

[0105] La mutagénesis por PCR también es adecuada para realizar variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido inicial, es decir, CBH2 de *H. jecorina*. Véase Higuchi, en *PCR Protocols*, pp.177-183 (Academic Press, 1990); y Vallette *et al., Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989). Véase, también, por ejemplo, Cadwell *et al., PCR Methods and Applications*, Vol 2, 28-33 (1992). En resumen, cuando se utilizan pequeñas cantidades de ADN plantilla como material inicial en una PCR, se pueden utilizar cebadores que difieren ligeramente en la secuencia de la región correspondiente en un ADN plantilla para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia de la plantilla solo en las posiciones en las que los cebadores difieren de la plantilla.

[0106] Otro método para preparar variantes, la mutagénesis por inserción de un casete, se basa en la técnica descrita por Wells *et al., Gene* 34:315-323 (1985). El material inicial es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN del polipéptido inicial a ser mutado. Se identifica el codón o los codones en el ADN inicial a ser mutado. Debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción en cada lado del sitio o de los sitios de mutación identificados. Si no existen dichos sitios de restricción, se pueden generar utilizando el método de mutagénesis mediada por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en localizaciones apropiadas en el ADN del polipéptido inicial. El ADN plasmídico se corta en estos sitios para linealizarlo. Un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción, pero que contiene la mutación o las mutaciones deseadas, se sintetiza utilizando procedimientos estándar, donde las dos cadenas del oligonucleótido se sintetizan por separado y después se hibridan juntas utilizando técnicas estándar. Este oligonucleótido bicatenario se denomina casete. Este casete está diseñado para que tenga extremos 5' y 3' compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de manera que se puede ligar directamente al plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de ADN mutada.

[0107] De manera alternativa, o adicional, se puede determinar la secuencia de aminoácidos deseada que codifica una variante de CBH2, y se puede generar sintéticamente una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha variante de secuencia de aminoácidos.

[0108] La variante o las variantes de CBH2 preparadas de esta manera se pueden someter a modificaciones adicionales, dependiendo a menudo del uso pretendido de la celulasa. Dichas modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, la fusión a un polipéptido o polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes.

## V. Ácidos nucleicos *cbh2* y polipéptidos CBH2.

### A. Variantes de ácidos nucleicos de tipo *cbh2*

[0109] La secuencia de ácido nucleico para la *cbh2* de *H. jecorina* natural se muestra en la Figura 1. Se abarca una molécula de ácido nucleico que codifica las variantes de celulasas descritas en el presente documento. El ácido nucleico puede ser una molécula de ADN.

[0110] Tras el aislamiento y la clonación de la *cbh2* de *H. jecorina*, se utilizan otros métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido, para realizar las sustituciones, adiciones o deleciones que corresponden a aminoácidos sustituidos en la variante de CBH2 expresada. De nuevo, la mutagénesis de sitio dirigido y otros métodos para incorporar cambios de aminoácidos en proteínas expresadas a nivel de ADN se pueden encontrar en Sambrook, *et al.* y Ausubel, *et al.*

[0111] Después de que se hayan clonado las secuencias de ADN que codifican las variantes de CBH2 en constructos de ADN, se utiliza el ADN para transformar microorganismos. El microorganismo a transformar con el propósito de expresar una variante de CBH2 puede comprender de manera ventajosa una cepa derivada de *Trichoderma sp.* De esta manera, un modo preferido para preparar una variante de celulasas CBH2 comprende transformar una célula huésped de *Trichoderma sp.* con un constructo de ADN que comprende al menos un fragmento de ADN que codifica una parte o toda la variante de CBH2. El constructo de ADN se unirá en general

de manera funcional a un promotor. La célula huésped transformada se cultiva entonces bajo condiciones para expresar la proteína deseada. Posteriormente, el producto de proteína deseada se puede purificar hasta una homogeneidad sustancial.

[0112] No obstante, de hecho, puede ser que el mejor vehículo de expresión para un ADN determinado que codifica una variante de CBH2 pueda diferir de *H. jecorina*. De este modo, puede ser que lo más ventajoso sea expresar una proteína en un huésped de transformación que porte similitud filogenética al organismo original para la variante de CBH2. En un modo de realización alternativo, se puede utilizar *Aspergillus niger* como vehículo de expresión. Para una descripción de técnicas de transformación con *A. niger*, véase WO 9813182.

[0113] Por consiguiente, se proporciona la presente descripción de un sistema de expresión de *Aspergillus spp.* con fines ilustrativos únicamente y como una opción para expresar la variante de CBH2. No obstante, un experto en la materia puede inclinarse por expresar el ADN que codifica la variante de CBH2 en una célula huésped diferente si procede y debe entenderse que el origen de la variante de CBH2 debería considerarse al determinar el huésped de expresión óptimo. Adicionalmente, el experto en la materia será capaz de seleccionar el mejor sistema de expresión para un gen concreto mediante técnicas rutinarias utilizando las herramientas disponibles en la técnica.

#### B. Polipéptidos de variantes de CBH2

[0114] La secuencia de aminoácidos para la CBH2 de *H. jecorina* natural se muestra en la Figura 1. Los polipéptidos de variantes de CBH2 comprenden una sustitución o delección en una posición correspondiente a uno o varios de los residuos V94, P98, G118, M120, M134, T142, L144, M145, T148, T154, L179, Q204, V206, S210, I212, T214, L215, G231, T232, V250, Q276, N285, S291, G308, T312, S316, V323, N325, I333, G334, S343, T349, G360, S380, A381, S386, F411, S413, A416, Q426 y/o A429 en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (SEQ ID NO: 2).

[0115] Un aspecto hace referencia a una enzima de CBH2 aislada de la familia Cel6A que tiene al menos una sustitución o delección de un residuo de aminoácido en una región seleccionada del grupo consistente en (1) de la posición 92 a la 100, (2) 115-123, (3) 140-155, (4) 160-180, (5) 198-218, (6) 228-235, (7) 240-260, (8) 275-295, (9) 305-318, (10) 322-335, (11) 340-350, (12) 360-370, (13) 378-390 y (14) 410-430. Otro aspecto hace referencia a una enzima de CBH2 aislada de la familia Cel6A que tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una región seleccionada del grupo consistente en (1) de la posición 92 a la 100, (2) 115-123, (3) 140-155, (4) 160-180, (5) 198-218, (6) 228-235, (7) 240-260, (8) 275-295, (9) 305-318, (10) 322-335, (11) 340-350, (12) 360-370, (13) 378-390 y (14) 410-430.

[0116] Las variantes de CBH2 tienen secuencias de aminoácidos que se derivan de la secuencia de aminoácidos de un precursor de CBH2. La secuencia de aminoácidos de la variante de CBH2 difiere de la secuencia de aminoácidos del precursor de CBH2 en la sustitución, delección o inserción de uno o varios aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del precursor. En un modo de realización preferido, el precursor de CBH2 es CBH2 de *Hypocrea jecorina*. La secuencia de aminoácidos inmadura de CBH2 de *H. jecorina* se muestra en la Figura 1. De esta manera, la exposición se dirige a variantes de CBH2 que contienen residuos de aminoácidos en posiciones que son equivalentes al residuo concreto identificado en CBH2 en *H. jecorina*. Un residuo (aminoácido) de un homólogo de CBH2 es equivalente a un residuo de CBH2 de *Hypocrea jecorina* si es homólogo (es decir, correspondiente en la posición en la estructura primaria o terciaria) o si es funcionalmente análogo a un residuo específico o parte de ese residuo en CBH2 de *Hypocrea jecorina* (es decir, que tiene la misma o similar capacidad funcional para combinarse, reaccionar, o interaccionar química o estructuralmente). Como se utiliza en el presente documento, la numeración pretende corresponder a la de la secuencia de aminoácidos de la CBH2 madura. Además de las localizaciones en el interior del precursor de CBH2, en el presente documento se identifican para sustitución o delección residuos específicos en el precursor de CBH2 correspondientes a las posiciones de aminoácidos que son responsables de la inestabilidad cuando el precursor de CBH2 se encuentra bajo estrés térmico. El número de posición de aminoácido (por ejemplo, +51) se refiere al número asignado a la secuencia de CBH2 madura de *Hypocrea jecorina*.

[0117] El alineamiento de las secuencias de aminoácidos para determinar la homología se determina preferiblemente utilizando un "algoritmo de comparación de secuencias". El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual. La inspección visual puede utilizar paquetes de gráficos tales como, por ejemplo, MOE de Chemical Computing Group, Montreal Canadá.

[0118] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica

(www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que coinciden con o cumplen alguna puntuación umbral T con valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Estas coincidencias de palabras iniciales  
 5 próximas actúan como puntos de partida para encontrar pares de secuencias de alta puntuación más largas que las contengan. Las coincidencias de palabras se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X a partir de un valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa es cero o inferior;  
 10 o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, expectación (E) de 10, M<sup>5</sup>, N<sup>-4</sup>, y una comparación de ambas cadenas.

**[0119]** El algoritmo BLAST realiza a continuación un análisis estadístico de la similitud entre las dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría al azar. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos se considera similar a una proteasa si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la secuencia de aminoácidos de prueba con respecto a una secuencia de aminoácidos de proteasa es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,01 y siendo lo más preferible inferior a aproximadamente 0,001.

**[0120]** Para fines de la presente invención, el grado de identidad se puede determinar adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP proporcionados en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575  
 25 Science Drive, Madison, Wis., USA 53711) (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-45), utilizando GAP con los siguientes ajustes para comparación de secuencias de polinucleótidos: penalización de creación GAP de 5,0 y penalización de extensión GAP de 0,3.

**[0121]** Las búsquedas de secuencias se llevan a cabo normalmente utilizando el programa BLASTN cuando se evalúa una secuencia de ácido nucleico determinada en relación con las secuencias de ácido nucleico de las secuencias de ADN de GenBank y otras bases de datos públicas. Se prefiere el programa BLASTX para buscar secuencias de ácidos nucleicos que se han traducido en todos los marcos de lectura con respecto a las secuencias de aminoácidos de las secuencias de proteínas de GenBank y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTN como BLASTX funcionan utilizando parámetros por defecto de una penalización de espacio abierto de 11,0, y una penalización de espacio extendido de 1,0, y utilizan la matriz BLOSUM-62. (Véase, por ejemplo,  
 30 Altschul, *et al.*, 1997.)

**[0122]** A continuación se proporcionan estrategias específicas adicionales para modificar la estabilidad de las celulasas CBH2:

(1) Disminuir la entropía del despliegue de la cadena principal puede introducir estabilidad a la enzima. Por ejemplo, la introducción de residuos de prolina puede estabilizar significativamente la proteína disminuyendo la entropía del despliegue (véase, por ejemplo, Watanabe, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 226:277-283 (1994)). De manera similar, los residuos de glicina no tienen  $\beta$ -carbono y, por lo tanto, tienen una libertad conformacional del esqueleto considerablemente mayor a la de muchos otros residuos. La sustitución de glicinas, preferiblemente por alaninas, puede reducir la entropía del despliegue y mejorar la estabilidad (véase, por ejemplo, Matthews, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6663-6667 (1987)). De manera adicional, acortando bucles externos puede ser posible mejorar la estabilidad. Se ha observado que las proteínas hipertérmofílicas producidas tienen bucles externos más cortos que sus homólogos mesofílicos (véase, por ejemplo, Russel, *et al.*, *Current Opinions in Biotechnology* 6:370-374 (1995)). La introducción de enlaces disulfuro también puede ser efectiva para estabilizar estructuras terciarias distintas en entre sí. De esta manera, la introducción de cisteínas en residuos accesibles a cisteínas existentes o la introducción de pares de cisteínas que podrían formar enlaces disulfuro alterarían la estabilidad de una variante de CBH2.

(2) Disminuir cavidades internas aumentando la hidrofobicidad de la cadena lateral puede alterar la estabilidad de una enzima. Reducir el número y el volumen de las cavidades internas aumenta la estabilidad de la enzima maximizando las interacciones hidrofóbicas y reduciendo los defectos de empaquetamiento (véase, por ejemplo, Matthews, *Ann. Rev. Biochem.* 62:139-160 (1993); Burley, *et al.*, *Science* 229:23-29 (1985); Zuber, *Biophys. Chem.* 29:171-179 (1988); Kellis, *et al.*, *Nature* 333:784-786 (1988)). Se sabe que las proteínas multiméricas de los termófilos a menudo tienen más interfaces de subunidades hidrofóbicas con una mayor complementariedad de superficies que sus homólogos mesofílicos (Russel, *et al.*, *supra*). Se cree que este principio es aplicable a interfaces de dominios de proteínas monoméricas. Las sustituciones específicas que pueden mejorar la estabilidad aumentando la hidrofobicidad incluyen lisina por arginina, serina por alanina y treonina por alanina (Russel, *et al.*, *supra*). La modificación mediante la sustitución por alanina o prolina puede aumentar el tamaño de la cadena lateral

con una reducción resultante en las cavidades, un mejor empaquetamiento y una mayor hidrofobicidad. Las sustituciones para reducir el tamaño de la cavidad, aumentar la hidrofobicidad y mejorar la complementariedad de las interfaces entre los dominios de CBH2 pueden mejorar la estabilidad de la enzima. Específicamente, la modificación del residuo específico en estas posiciones con un residuo diferente seleccionado de entre cualquiera de fenilalanina, triptófano, tirosina, leucina e isoleucina puede mejorar el rendimiento.

(3) Equilibrar las cargas en la estructura secundaria rígida, es decir, hélices  $\alpha$  y giros  $\beta$  puede mejorar la estabilidad. Por ejemplo, neutralizar cargas positivas parciales en una hélice N-terminal con carga negativa en ácido aspártico puede mejorar la estabilidad de la estructura (véase, por ejemplo, Eriksson, *et al.*, *Science* 255:178-183 (1992)). De manera similar, neutralizar cargas negativas parciales en una hélice C-terminal con carga positiva puede mejorar la estabilidad. Eliminar carga positiva de la interacción con el péptido N-terminal en giros- $\beta$  debe ser eficaz para conferir estabilidad a la estructura terciaria. La sustitución con un residuo no cargado positivamente podría eliminar una carga positiva desfavorable de la interacción con un nitrógeno amídico presente en un giro.

(4) Introducir puentes de sal y enlaces de hidrógeno para estabilizar estructuras terciarias puede ser eficaz. Por ejemplo, las interacciones de pares de iones, por ejemplo, entre ácido aspártico o ácido glutámico y lisina, arginina o histidina pueden introducir efectos de estabilización intensos y se pueden utilizar para unir diferentes elementos de estructura terciaria con una mejora resultante en la termoestabilidad. De manera adicional, los aumentos en el número de enlaces de hidrógeno de residuo cargado/residuo no cargado, y el número de enlaces de hidrógeno, en general, pueden mejorar la termoestabilidad (véase, por ejemplo, Tanner, *et al.*, *Biochemistry* 35:2597-2609 (1996)). La sustitución por ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico o glutamina puede introducir un enlace de hidrógeno con una amida del esqueleto. La sustitución por arginina puede mejorar un puente de sal e introducir un enlace de H en un carbonilo del esqueleto.

(5) Evitar los residuos termolábiles en general puede aumentar la estabilidad térmica. Por ejemplo, la asparagina y la glutamina son susceptibles a la desamidación y la cisteína es susceptible a la oxidación a altas temperaturas. Reducir el número de estos residuos en posiciones sensibles puede dar lugar a una termoestabilidad mejorada (Russel, *et al.*, *supra*). La sustitución o delección por cualquier residuo distinto a glutamina o cisteína puede aumentar la estabilidad evitando un residuo termolábil.

(6) La estabilización o desestabilización de la unión de un ligando que confiere estabilidad modificada a variantes de CBH2. Por ejemplo, un componente de la matriz en la que se utilizan las variantes de CBH2 se puede unir a un sitio de surfactante específico/sitio de sensibilidad térmica de la variante de CBH2. Modificando el sitio mediante sustitución, la unión del componente a la variante se puede fortalecer o disminuir. Por ejemplo, un residuo no aromático en la hendidura de unión de CBH2 se puede sustituir con fenilalanina o tirosina para introducir estabilización de cadena lateral aromática donde la interacción del sustrato de celulosa puede interactuar de manera favorable con los anillos bencílicos, aumentando la estabilidad de la variante de CBH2.

(7) Aumentar la electronegatividad de cualquiera de los ligandos de surfactante/sensibilidad térmica puede mejorar la estabilidad bajo surfactante o estrés térmico. Por ejemplo, la sustitución con fenilalanina o tirosina puede aumentar la electronegatividad de los residuos D (aspartato) mejorando la protección del disolvente, mejorando así la estabilidad.

## VI. Expresión de variantes de CBH2 recombinantes

**[0123]** Los métodos se basan en la utilización de células para expresar la variante de CBH2, sin que se requiera ningún método concreto de expresión de la CBH2. La CBH2 se secreta preferiblemente de las células.

**[0124]** Se proporcionan células huésped que se han transducido, transformado o transfectado con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de CBH. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas anteriormente para la célula huésped parental antes de la transducción, transformación o transfección y resultarán evidentes para los expertos en la materia.

**[0125]** En un enfoque, se transfecta una célula de hongo filamentoso o una célula de levadura con un vector de expresión que tiene un promotor o un fragmento de promotor biológicamente activo o uno o varios (por ejemplo, una serie) de los potenciadores que funciona en la línea de la célula huésped, operativamente unidos a un segmento de ADN que codifica CBH2, de manera que la CBH2 se expresa en la línea celular.

### A. Vectores de expresión/Constructos de ácido nucleico

**[0126]** Se pueden incorporar fragmentos de polinucleótidos naturales o sintéticos que codifican CBH2 ("secuencias de ácido nucleico que codifican CBH2") en vectores o constructos de ácido nucleico heterólogos, capaces de la introducción y la replicación en una célula de levadura o de hongo filamentoso. Los vectores y métodos descritos en el presente documento son adecuados para utilizarse en células huésped para la expresión de CBH2. Se puede utilizar cualquier vector siempre que sea replicable y viable en las células en las que se introduce. Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. Los vectores de clonación y expresión también se describen en Sambrook *et al.*,

1989, Ausubel FM *et al.*, 1989, y Strathern *et al.*, *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 1981. Se describen vectores de expresión adecuados para hongos en van den Hondel, C.A.M.J.J. *et al.* (1991) En: Bennett, J.W. y Lasure, L.L. (eds.) *More Gene Manipulations in Fungi*. Academic Press, pp. 396-428. La secuencia de ADN adecuada se puede insertar en un plásmido o vector (denominados colectivamente en el presente documento como "vectores") mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción adecuado(s) mediante procedimientos estándar. Se considera que dichos procedimientos y los procedimientos de subclonación relacionados están dentro del alcance del conocimiento de los expertos en la materia.

**[0127]** Se pueden producir hongos filamentosos recombinantes que comprenden la secuencia de codificación para la variante de CBH2 introduciendo un constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de codificación de la variante de CBH2 en las células de una cepa seleccionada de los hongos filamentosos.

**[0128]** Una vez que se obtiene la forma deseada de una secuencia de ácido nucleico de la variante de *cbh2*, se puede modificar de diversas maneras. Cuando la secuencia implica regiones flanqueantes no codificantes, las regiones flanqueantes se pueden someter a resección, mutagénesis, etc. De esta manera, se pueden realizar transiciones, transversiones, deleciones e inserciones en la secuencia de origen natural.

**[0129]** Puede insertarse una secuencia de codificación de la variante de *cbh2* seleccionada en un vector adecuado de conformidad con técnicas recombinantes bien conocidas y utilizarse para transformar los hongos filamentosos capaces de la expresión de CBH2. Debido a la degeneración inherente del código genético, se pueden utilizar otras secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual o funcionalmente equivalente para clonar y expresar la variante de CBH2. Por lo tanto, se entiende que dichas sustituciones en la región de codificación están dentro de las variantes de secuencias cubiertas. Se pueden utilizar todas y cada una de las variantes de secuencia de la misma manera que se describe en el presente documento para una secuencia de ácido nucleico parental que codifica CBH2.

**[0130]** También están incluidos constructos de ácido nucleico recombinante que comprende una o varias de las secuencias de ácido nucleico que codifican variantes de CBH2 como se describe anteriormente. Los constructos comprenden un vector, tal como un plásmido o vector viral, en el que se ha insertado una secuencia, en una orientación directa o inversa.

**[0131]** Los constructos de ácido nucleico heterólogos pueden incluir la secuencia de codificación para la variante de *cbh2*: (i) de manera aislada; (ii) en combinación con secuencias de codificación adicionales; tales como secuencias de codificación de proteína de fusión o de péptido señal, en las que la secuencia que codifica *cbh2* es la secuencia de codificación dominante; (iii) en combinación con secuencias no codificantes, tales como intrones y elementos de control, tales como elementos promotores y terminadores o regiones 5' y/o 3' no traducidas, eficaces para la expresión de la secuencia de codificación en un huésped adecuado; y/o (iv) en un vector o medio huésped en el que la secuencia que codifica *cbh2* es un gen heterólogo.

**[0132]** En un aspecto, se emplea un constructo de ácido nucleico heterólogo para transferir una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 en una célula *in vitro*, con líneas de levadura y de hongos filamentosos establecidos preferidas. Para la producción a largo plazo de la variante de CBH2, se prefiere la expresión estable. Se deduce que se puede utilizar cualquier método efectivo para generar transformantes estables.

**[0133]** Los vectores adecuados están normalmente equipados con una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable, sitios de inserción y elementos de control adecuados, tales como secuencias de promotor y de terminación. El vector puede comprender secuencias reguladoras, que incluyen, por ejemplo, secuencias no codificantes, tales como intrones y elementos de control, es decir, elementos promotores y terminadores o regiones 5' y/o 3' no traducidas, eficaces para la expresión de la secuencia de codificación en células huésped (y/o en un medio de célula huésped o vector en el que normalmente no se expresa una secuencia de codificación de antígeno de proteína soluble modificada), operativamente unidas a la secuencia de codificación. Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores y promotores adecuados, muchos de los cuales están disponibles comercialmente y/o se describen en Sambrook, *et al.*, (*supra*).

**[0134]** Promotores de ejemplo incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles, ejemplos de los cuales incluyen un promotor CMV, un promotor SV40 temprano, un promotor RSV, un promotor EF-1 $\alpha$ , un promotor que contiene el elemento de respuesta Tet (TRE, por sus siglas en inglés) en el sistema tet-on o tet-off como se describe (ClonTech y BASF), el promotor beta actina y el promotor metalotionina que se pueden regular por incremento mediante la adición de ciertas sales de metales. Una secuencia promotora es una secuencia de ADN que es reconocida por el hongo filamentosos concreto para propósitos de expresión. Está operativamente unida a una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de variante de CBH2. Dicha unión comprende el posicionamiento del promotor con respecto al codón de iniciación de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de variante de CBH2 en los vectores de expresión descritos. La secuencia del promotor contiene secuencia de control de la transcripción y la traducción que media en la expresión del polipéptido de variante de CBH2. Ejemplos incluyen los promotores de genes que codifican glucoamilasa, alfa-amilasa, o alfa-glucosidasa

de *Aspergillus niger*, *A. awamori* o *A. oryzae*; los genes *gpdA* o *trpC* de *A. nidulans*; los genes *cbh1* o *trp1* de *Neurospora crassa*; los genes que codifican proteínasa aspártica de *A. niger* o *Rhizomucor miehei*; los genes que codifican *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, u otras celulasas de *H. jecorina* (*T. reesei*).

5 [0135] La elección del marcador seleccionable adecuado dependerá de la célula huésped, y en la técnica se conocen bien los marcadores adecuados para diferentes huéspedes. Los genes marcadores seleccionables típicos incluyen *argB* de *A. nidulans* o *T. reesei*, *amdS* de *A. nidulans*, *pyr4* de *Neurospora crassa* o *T. reesei*, *pyrG* de *Aspergillus niger* o *A. nidulans*. Ejemplos adicionales de marcadores seleccionables incluyen, pero sin carácter limitativo, *trpc*, *trp1*, *oliC31*, *niaD* o *leu2*, que se incluyen en constructos de ácido nucleico heterólogo utilizados para transformar una cepa mutante tal como *trp-*, *pyr-*, *leu-* y similares.

10 [0136] Dichos marcadores seleccionables confieren a los transformantes la capacidad de utilizar un metabolito que normalmente no es metabolizado por los hongos filamentosos. Por ejemplo, el gen *amdS* de *H. jecorina* que codifica la enzima acetamidasa que permite que las células transformantes crezcan en acetamida como fuente de nitrógeno. El marcador seleccionable (por ejemplo, *pyrG*) puede restaurar la capacidad de una cepa mutante auxotrófica para crecer en un medio mínimo selectivo o el marcador seleccionable (por ejemplo, *olic31*) puede conferir a los transformantes la capacidad de crecer en presencia de un fármaco inhibidor o antibiótico.

15 [0137] La secuencia de codificación del marcador seleccionable se clona en cualquier plásmido adecuado utilizando métodos generalmente empleados en la técnica. Ejemplos de plásmidos incluyen pUC18, pBR322, pRAX y pUC100. El plásmido pRAX contiene secuencias AMA1 de *A. nidulans*, que posibilitan la replicación en *A. niger*.

20 [0138] La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989; Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Ausubel, *et al.*, 1993; y Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 1991.

## 25 B. Células huésped y condiciones de cultivo para la producción de CBH2

### (i). Hongos filamentosos

[0139] De esta manera, la presente descripción proporciona hongos filamentosos que comprenden células que han sido modificadas, seleccionadas y cultivadas de manera efectiva para dar lugar a la producción o expresión de variante de CBH2 con respecto a los correspondientes hongos parentales no transformados.

30 [0140] Ejemplos de especies de hongos filamentosos parentales que se pueden tratar y/o modificar para la expresión de variante de CBH2 incluyen, pero sin carácter limitativo, *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*; *Penicillium sp.*, *Humicola sp.*, incluyendo *Humicola insolens*; *Aspergillus sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Hypocrea sp.*, y *Emericella sp.*

35 [0141] Las células que expresan CBH2 se cultivan bajo condiciones normalmente empleadas para cultivar la línea fúngica parental. Generalmente, las células se cultivan en un medio estándar que contiene sales fisiológicas y nutrientes, tal como se describe en Pourquie, J. *et al.*, *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, eds. Aubert, J. P. *et al.*, Academic Press, pp. 71-86, 1988 e Ilmen, M. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1298-1306, 1997. Las condiciones de cultivo también son estándar, por ejemplo, los cultivos se incuban a 28 °C en agitadores de cultivos o fermentadores hasta que se consiguen niveles de expresión de CBH2 deseados.

40 [0142] Las condiciones de cultivo preferidas para un hongo filamentoso determinado se pueden encontrar en la literatura científica y/o de la fuente de los hongos, tal como la American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org/). Después de establecer crecimiento fúngico, las células se exponen a condiciones efectivas para causar o permitir la expresión de la variante de CBH2.

45 [0143] En casos en los que una secuencia que codifica CBH2 está bajo el control de un promotor inducible, el agente inductor, por ejemplo, un azúcar, una sal de metal o antibióticos, se añade al medio en una concentración efectiva para inducir la expresión de CBH2.

50 [0144] En un modo de realización, la cepa comprende *Aspergillus niger*, que es una cepa útil para obtener proteína sobreexpresada. Por ejemplo, se sabe que *A. niger var awamori dgr246* secreta cantidades elevadas de celulasas secretadas (Goedegebuur *et al*, *Curr. Genet* (2002) 41: 89-98). Se conocen otras cepas de *Aspergillus niger varawamori*, tales como GCDAP3, GCDAP4 y GAP3-4 Ward *et al* (Ward, M, Wilson, L.J. y Kodama, K.H., 1993, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743).

55 [0145] En otro modo de realización, la cepa comprende *Trichoderma reesei*, que es una cepa útil para obtener proteína sobreexpresada. Por ejemplo, se sabe que RL-P37, descrita por Sheir-Neiss, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:46-53 (1984) secreta cantidades elevadas de enzimas de celulasa. Los equivalentes funcionales

de RL-P37 incluyen la cepa RUT-C30 (ATCC n.º 56765) y la cepa QM9414 (ATCC n.º 26921) de *Trichoderma reesei*. Se contempla que estas cepas también serían útiles en la sobreexpresión de la variante de CBH2.

**[0146]** Cuando se desea obtener la variante de CBH2 en ausencia de actividad celulolítica nativa potencialmente perjudicial, es útil obtener una cepa de célula huésped de *Trichoderma* en la que se hayan delecionado uno o varios genes de celulasa antes de la introducción de un constructo de ADN o plásmido que contiene el fragmento de ADN que codifica la variante de CBH2. Dichas cepas se pueden preparar mediante el método descrito en la patente estadounidense n.º 5.246.853 y WO 92/06209. Mediante la expresión de una variante de celulasa CBH2 en un microorganismo huésped al que le falta uno o varios genes de celulasa, se simplifican los procedimientos de identificación y posterior purificación. Cualquier gen de *Trichoderma sp.* que se haya clonado se puede delecionar, por ejemplo, los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, y *egl2*, así como los que codifican la proteína EG III y/o EG V (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.475.101 y WO 94/28117, respectivamente).

**[0147]** La delección de genes se puede conseguir insertando una forma del gen que se desea delecionar o alterar en un plásmido mediante métodos conocidos en la técnica. El plásmido de delección se corta a continuación en un sitio o sitios de enzimas de restricción apropiado(s), interno a la región de codificación del gen deseado, y la secuencia que codifica el gen o parte de la misma se sustituye por un marcador seleccionable. Las secuencias de ADN flanqueantes del lugar del gen a delecionar o alterar, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 kb y 2,0 kb, permanecen en cualquier lado del gen del marcador seleccionable. Un plásmido de delección adecuado tendrá generalmente sitios únicos de enzimas de restricción presentes en el mismo para permitir que se eliminen el fragmento que contiene el gen delecionado, incluyendo las secuencias de ADN flanqueantes, y el gen del marcador seleccionable como una única pieza lineal.

**[0148]** Se debe elegir un marcador seleccionable que permita la detección del microorganismo transformado. Cualquier gen del marcador seleccionable que se exprese en el microorganismo seleccionado será adecuado. Por ejemplo, con *Aspergillus sp.*, el marcador seleccionable se elige de manera que la presencia del marcador seleccionable en los transformantes no afecte significativamente a las propiedades de los mismos. Dicho marcador seleccionable puede ser un gen que codifica un producto analizable. Por ejemplo, se puede utilizar una copia funcional de un gen de *Aspergillus sp.* que si falta en la cepa huésped dé lugar a que la cepa huésped muestre un fenotipo auxotrófico. De manera similar, existen marcadores seleccionables para *Trichoderma sp.*

**[0149]** En un modo de realización, se transforma una cepa derivada de *pyrG* de *Aspergillus sp.* con un gen *pyrG* funcional, que proporciona de esta manera un marcador seleccionable para la transformación. Se puede obtener una cepa derivada de *pyrG* mediante la selección de cepas de *Aspergillus sp.* que son resistentes al ácido fluoroorótico (FOA, por sus siglas en inglés). El gen *pyrG* codifica la orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa, una enzima requerida para la biosíntesis de uridina. Las cepas con un gen *pyrG* intacto crecen en un medio que carece de uridina, pero son sensibles al ácido fluoroorótico. Es posible seleccionar cepas derivadas de *pyrG* que carecen de una enzima de orotidina monofosfato descarboxilasa funcional y requieren uridina para el crecimiento mediante la selección de resistencia al FOA. Utilizando la técnica de selección del FOA también es posible obtener cepas que requieren uridina que carecen de una orotato pirofosforribosil transferasa funcional. Es posible transformar estas células con una copia funcional del gen que codifica esta enzima (Berges & Barreau, *Curr. Genet.* 19:359-365 (1991), y van Hartingsveldt *et al.*, (1986) *Development of a homologous transformation system for Aspergillus niger based on the pyrG gene.* *Mol. Gen. Genet.* 206:71-75). La selección de cepas derivadas se realiza fácilmente utilizando la técnica de resistencia al FOA mencionada anteriormente y, de este modo, el gen *pyrG* se emplea preferiblemente como marcador seleccionable.

**[0150]** En un segundo modo de realización, se transforma una cepa derivada de *pyr4* de *Hyprocrea sp.* (*Hyprocrea sp.* (*Trichoderma sp.*)) con un gen *pyr4* funcional, que proporciona de esta manera un marcador seleccionable para la transformación. Se puede obtener una cepa derivada de *pyr4* mediante la selección de cepas de *Hyprocrea sp.* (*Trichoderma sp.*) que son resistentes al ácido fluoroorótico (FOA). El gen *pyr4* codifica la orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa, una enzima requerida para la biosíntesis de uridina. Las cepas con un gen *pyr4* intacto crecen en un medio que carece de uridina, pero son sensibles al ácido fluoroorótico. Es posible seleccionar cepas derivadas de *pyr4* que carecen de una enzima de orotidina monofosfato descarboxilasa funcional y requieren uridina para el crecimiento mediante la selección de resistencia al FOA. Utilizando la técnica de selección del FOA también es posible obtener cepas que requieren uridina que carecen de una orotato pirofosforribosil transferasa funcional. Es posible transformar estas células con una copia funcional del gen que codifica esta enzima (Berges & Barreau, 1991). La selección de cepas derivadas se realiza fácilmente utilizando la técnica de resistencia al FOA mencionada anteriormente y, de este modo, el gen *pyr4* se emplea preferiblemente como marcador seleccionable.

**[0151]** Para transformar *pyrG* de *Aspergillus sp.* o *pyr4* de *Hyprocrea sp.* (*Trichoderma sp.*) para que carezcan de la capacidad para expresar uno o varios genes de celulasa, un fragmento de ADN simple que comprende un gen de celulasa alterado o delecionado se aísla entonces del plásmido de delección y se utiliza para transformar un huésped *pyr* de *Aspergillus* o *pyr* de *Trichoderma* adecuado. A continuación, se identifican los transformantes y se seleccionan basándose en su capacidad para expresar el producto génico de *pyrG* o *pyr4*, respectivamente, y complementar de esta manera la auxotrofia de uridina de la cepa huésped. A continuación, se lleva a cabo un

análisis de transferencia Southern en los transformantes resultantes para identificar y confirmar un caso de integración de doble cruzamiento que sustituye parte o toda la región de codificación de la copia genómica del gen a delecionar por los marcadores seleccionables *pyr* adecuados.

5 **[0152]** Aunque los vectores plasmídicos específicos descritos anteriormente se refieren a la preparación de transformantes de *pyr*, la presente exposición no está limitada a estos vectores. Se pueden delecionar y sustituir varios genes en la cepa de *Aspergillus sp.* o *Hyprocrea sp.* (*Trichoderma sp.*) utilizando las técnicas anteriores. Además, se puede utilizar cualquier marcador seleccionable disponible, como se describe anteriormente. De hecho, cualquier gen de huésped, por ejemplo, *Aspergillus sp.* o *Hyprocrea sp.*, que haya sido clonado y, de esta manera, identificado, se puede delecionar del genoma utilizando la estrategia descrita anteriormente.

10 **[0153]** Como se indica anteriormente, las cepas huésped utilizadas pueden ser derivadas de *Hyprocrea sp.* (*Trichoderma sp.*) que carecen de o tienen un gen o genes no funcional(es) correspondiente(s) al marcador seleccionable elegido. Por ejemplo, si se elige el marcador seleccionable de *pyrG* para *Aspergillus sp.*, entonces se utiliza una cepa derivada de *pyrG*<sup>-</sup> específica como receptor en el procedimiento de transformación. Además, por ejemplo, si se elige el marcador seleccionable de *pyr4* para una *Hyprocrea sp.*, entonces se utiliza una cepa  
15 derivada de *pyr4* específica como receptor en el procedimiento de transformación. De manera similar, se pueden utilizar los marcadores seleccionables que comprenden genes de *Hyprocrea sp.* (*Trichoderma sp.*) equivalentes a los genes *amdS*, *argB*, *trpC*, *niaD* de *Aspergillus nidulans*. Por lo tanto, la cepa receptora correspondiente debe ser una cepa derivada, tal como *argB*<sup>-</sup>, *trpC*<sup>-</sup>, *niaD*<sup>-</sup>, respectivamente.

20 **[0154]** A continuación, se prepara el ADN que codifica la variante de CBH2 para la inserción en un microorganismo adecuado. El ADN que codifica una variante de CBH2 comprende el ADN necesario para codificar una proteína que tiene actividad celulolítica funcional. El fragmento de ADN que codifica la variante de CBH2 puede unirse funcionalmente a una secuencia promotora fúngica, por ejemplo, el promotor del gen *glaA* en *Aspergillus* o el promotor de los genes *cbh1* o *egl1* en *Trichoderma*.

25 **[0155]** También se contempla que más de una copia de ADN que codifica una variante de CBH2 se pueda recombinar en la cepa para facilitar la sobreexpresión. El ADN que codifica la variante de CBH2 se puede preparar mediante la construcción de un vector de expresión que porta el ADN que codifica la variante. El vector de expresión que porta el fragmento de ADN insertado que codifica la variante de CBH2 puede ser cualquier vector que sea capaz de replicarse de manera autónoma en un organismo huésped determinado o de integrarse  
30 en el ADN del huésped, normalmente un plásmido. En modos de realización preferidos, se contemplan dos tipos de vectores de expresión para obtener la expresión de los genes. El primero contiene secuencias de ADN en las que el promotor, la región de codificación del gen y la secuencia terminadora se originan todas del gen a expresar. El truncamiento del gen se puede obtener cuando se desee delecionando las secuencias de ADN no deseadas (por ejemplo, que codifican dominios no deseados) para dejar que el dominio se exprese bajo el control de sus propias secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción. Un marcador seleccionable  
35 también puede contenerse en el vector que permite la selección para la integración en el huésped de múltiples copias de las nuevas secuencias de genes.

40 **[0156]** El segundo tipo de vector de expresión se preensambla y contiene secuencias requeridas para la transcripción a alto nivel y un marcador seleccionable. Se contempla que la región codificante para un gen o parte del mismo se puede insertar en este vector de expresión de propósito general, de manera que está bajo el control transcripcional de las secuencias de promotor y terminador de los casetes de expresión.

**[0157]** Por ejemplo, en *Aspergillus*, pRAX es dicho vector de expresión de propósito general. Se pueden insertar genes o partes de los mismos secuencia abajo del promotor *glaA* fuerte.

**[0158]** Por ejemplo, en *Hyprocrea*, pTEX es dicho vector de expresión de propósito general. Se pueden insertar genes o partes de los mismos secuencia abajo del promotor *cbh1* fuerte.

45 **[0159]** En el vector, la secuencia de ADN que codifica la variante de CBH2 debe estar operativamente unida a las secuencias de transcripción y traducción, es decir, una secuencia promotora y una secuencia señal adecuadas en el marco de lectura al gen estructural. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped y puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. Un péptido señal opcional proporciona la producción extracelular  
50 de la variante de CBH2. El ADN que codifica la secuencia señal es preferiblemente el que está asociado de manera natural al gen a expresar, aunque se contempla la secuencia señal de cualquier fuente adecuada, por ejemplo una exocelobiohidrolasa o endoglucanasa de *Trichoderma*.

**[0160]** Los procedimientos utilizados para ligar las secuencias de ADN que codifican la variante de CBH2 con el promotor, y la inserción en vectores adecuados se conocen bien en la técnica.

55 **[0161]** El vector o constructo de ADN descrito anteriormente puede introducirse en la célula huésped según técnicas conocidas, tales como transformación, transfección, microinyección, microporación, bombardeo biolístico y similares.

**[0162]** En la técnica de transformación preferida, debe tenerse en cuenta que la permeabilidad de la pared celular al ADN en *Hyprocrea sp. (Trichoderma sp.)* es muy baja. Por consiguiente, la absorción de la secuencia de ADN deseada, el gen o el fragmento de gen es, como mucho, mínima. Existen varios métodos para aumentar la permeabilidad de la pared celular de *Hyprocrea sp. (Trichoderma sp.)* en la cepa derivada (es decir, que carece de un gen funcional correspondiente al marcador seleccionable utilizado) antes del proceso de transformación.

**[0163]** El método preferido para preparar *Aspergillus sp. o Hyprocrea sp. (Trichoderma sp.)* para la transformación implica la preparación de protoplastos a partir de micelio fúngico. Véase Campbell et al, Improved transformation efficiency of *A.niger* using homologous *niaD* gene for nitrate reductase. Curr. Genet. 16:53-56; 1989. El micelio se puede obtener de esporas vegetativas germinadas. El micelio se trata con una enzima que digiere la pared celular dando lugar a protoplastos. A continuación, los protoplastos se protegen mediante la presencia de un estabilizador osmótico en el medio de suspensión. Estos estabilizadores incluyen sorbitol, manitol, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y similares. Normalmente, la concentración de estos estabilizadores varía entre 0,8 M y 1,2 M. Es preferible utilizar aproximadamente una solución de 1.2 M de sorbitol en el medio de suspensión.

**[0164]** La absorción del ADN en la cepa huésped, (*Aspergillus sp. o Hyprocrea sp. (Trichoderma sp.)*), depende de la concentración de ion calcio. En general, se utilizan entre aproximadamente 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  en una solución de absorción. Además de la necesidad del ion calcio en la solución de absorción, otros elementos incluidos generalmente son un sistema tampón, tal como un tampón TE (10 mM de Tris, pH 7.4; 1 mM de EDTA) o 10 mM de tampón MOPS, pH 6.0. (ácido morfolinopropanosulfónico) y polietilenglicol (PEG). Se cree que el polietilenglicol actúa para fusionar las membranas celulares, permitiendo de esta manera que se distribuya el contenido del medio en el citoplasma de la célula huésped, a modo de ejemplo la cepa de *Aspergillus sp. o Hyprocrea sp.* y el ADN plasmídico se transfiere al núcleo. Esta fusión deja frecuentemente múltiples copias del ADN plasmídico integradas en el cromosoma huésped.

**[0165]** Normalmente, en la transformación se utiliza una suspensión que contiene los protoplastos o células de *Aspergillus sp.* que han sido sometidos a un tratamiento de permeabilidad a una densidad de  $10^5$  a  $10^6$ /mL, preferiblemente  $2 \times 10^5$ /mL. De manera similar, en la transformación se utiliza una suspensión que contiene los protoplastos o células de *Hyprocrea sp. (Trichoderma sp.)* que han sido sometidos a un tratamiento de permeabilidad a una densidad de  $10^8$  a  $10^9$ /mL, preferiblemente  $2 \times 10^8$ /mL. Se mezcla un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de estos protoplastos o células en una solución adecuada (por ejemplo, 1,2 M de sorbitol; 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ ) con el ADN deseado. En general, se añade una concentración alta de PEG a la solución de absorción. Se puede añadir de 0,1 a 1 volumen de PEG 4000 al 25 % a la suspensión de protoplastos. No obstante, es preferible añadir aproximadamente 0,25 volúmenes a la suspensión de protoplastos. También se pueden añadir aditivos, tales como dimetilsulfóxido, heparina, espermidina, cloruro de potasio y similares, a la solución de absorción y ayudar en la transformación.

**[0166]** En general, la mezcla se incuba a continuación a aproximadamente 0 °C durante un periodo entre 10 y 30 minutos. A continuación se añade PEG adicional a la mezcla para mejorar de manera adicional la absorción de la secuencia de ADN o del gen deseado. El PEG 4000 al 25 % se añade generalmente en volúmenes de 5 a 15 veces el volumen de la mezcla de transformación; no obstante, volúmenes mayores o menores pueden ser adecuados. El PEG 4000 al 25 % es preferiblemente aproximadamente 10 veces el volumen de la mezcla de transformación. Después de añadir el PEG, la mezcla de transformación se incuba a continuación a temperatura ambiente o en hielo antes de la adición de una solución de sorbitol y  $\text{CaCl}_2$ . A continuación, la suspensión de protoplastos se añade a alícuotas fundidas de un medio de crecimiento. Este medio de crecimiento permite el crecimiento de transformantes únicamente. Se puede utilizar cualquier medio de crecimiento que sea adecuado para el crecimiento de los transformantes deseados. No obstante, si se seleccionan los transformantes *Pyr<sup>+</sup>*, es preferible utilizar un medio de crecimiento que no contenga uridina. Las colonias posteriores se transfieren y se purifican en un medio de crecimiento agotado de uridina.

**[0167]** En esta etapa, se pueden diferenciar los transformantes estables de los transformantes inestables por su índice de crecimiento más rápido y, en *Trichoderma*, por ejemplo, la formación de colonias circulares con un contorno liso en vez de irregular en el medio de cultivo sólido que carece de uridina. De manera adicional, en algunos casos se puede realizar una prueba adicional de estabilidad mediante el crecimiento de los transformantes en un medio sólido no selectivo (es decir, que contiene uridina), la recogida de esporas de este medio de cultivo y la determinación del porcentaje de estas esporas que germinarán posteriormente y crecerán en un medio selectivo que carece de uridina.

**[0168]** En un modo de realización concreto del método anterior, la(s) variante(s) de CBH2 se recupera(n) en forma activa de la célula huésped después del crecimiento en medios líquidos como resultado del procesamiento post traduccional adecuado de la variante de CBH2.

**(ii) Levadura**

**[0169]** También se contempla la utilización de levadura como célula huésped para la producción de CBH2. Varios otros genes que codifican enzimas hidrolíticas se han expresado en varias cepas de la levadura *S. cerevisiae*. Estos incluyen secuencias que codifican dos endoglucanasas (Penttila *et al.*, *Yeast* vol. 3, pp 175-185, 1987), dos celobiohidrolasas (Penttila *et al.*, *Gene*, 63:103-112, 1988) y una beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei* (Cummings y Fowler, *Curr. Genet.* 29:227-233, 1996), una xilanasa de *Aureobasidium pullulans* (Li y Ljungdahl, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, n.º 1, pp. 209-213, 1996), una alfa amilasa de trigo (Rothstein *et al.*, *Gene* 55:353-355, 1987), etc. Además, un casete del gen de celulasa que codifica la endo-[beta] -1,4-glucanasa (END1) de *Butyrivibrio fibrisolvens*, celobiohidrolasa (CBH1) de *Phanerochaete chrysosporium*, la celodextrinasa (CEL1) de *Ruminococcus flavefaciens* y la celobiasa de *Endomyces fibrilizer* (Bgl1) se expresó satisfactoriamente en una cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* (Van Rensburg *et al.*, *Yeast*, vol. 14, pp. 67-76, 1998).

**C. Introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica CBH2 en células huésped.**

**[0170]** Se proporcionan, además, células y composiciones celulares que han sido modificadas genéticamente para comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 proporcionada de manera exógena. Se puede modificar genéticamente una célula parental o línea celular (es decir, transducirse, transformarse o transfectarse) con un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una particular viral, un fago, etc., como se describe de manera adicional anteriormente.

**[0171]** Los métodos de transformación pueden dar lugar a la integración estable de todo o parte del vector de transformación en el genoma del hongo filamentoso. No obstante, también se contempla la transformación que da lugar al mantenimiento de un vector de transformación extracromosómico autorreplicante.

**[0172]** Se pueden utilizar muchos métodos de transfección estándar para producir líneas celulares de *Trichoderma reesei* que expresen grandes cantidades de la proteína heteróloga. Algunos de los métodos publicados para la introducción de constructos de ADN en cepas que producen celulasa de *Trichoderma* incluyen Lorito, Hayes, DiPietro y Harman, 1993, *Curr. Genet.* 24:349-356; Goldman, VanMontagu y Herrera-Estrella, 1990, *Curr. Genet.* 17:169-174; Penttila, Nevalainen, Ratto, Salminen y Knowles, 1987, *Gene* 6:155-164, para *Aspergillus* Yelton, Hamer y Timberlake, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474, para *Fusarium* Bajar, Podila y Kolattukudy, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8202-8212, para *Streptomyces* Hopwood *et al.*, 1985, The John Innes Foundation, Norwich, UK y para *Bacillus* Brigidi, DeRossi, Bertarini, Riccardi y Matteuzzi, 1990, *FEMS Microbiol. Lett.* 55: 135-138).

**[0173]** Otros métodos para introducir un constructo de ácido nucleico heterólogo (vector de expresión) en hongos filamentosos (por ejemplo, *H. jecorina*) incluyen, pero sin carácter limitativo, la utilización de una pistola de genes o de partículas, permeabilización de las paredes celulares de hongos filamentosos antes del proceso de transformación (por ejemplo, mediante la utilización de altas concentraciones de álcali, por ejemplo, 0,05 M a 0,4 M de CaCl<sub>2</sub> o acetato de litio), fusión de protoplastos o transformación mediada por *Agrobacterium*. Se describe un método de ejemplo para la transformación de hongos filamentosos mediante el tratamiento de protoplastos o esferoplastos con polietilenglicol y CaCl<sub>2</sub> en Campbell, E.1. *et al.*, *Curr. Genet.* 16:53-56, 1989 y Penttila, M. *et al.*, *Gene*, 63:11-22, 1988.

**[0174]** Se puede utilizar cualquiera de los procedimientos conocidos para introducir secuencias de nucleótidos exógenas en células huésped. Estos incluyen la utilización de la transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, biolística, liposomas, microinyección, vectores plasma, vectores virales y cualquiera de los otros métodos conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético exógeno en una célula huésped (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*). También se utiliza el método de transfección mediada por *Agrobacterium* descrito en la patente estadounidense n.º 6.255.115. Solo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética concreto utilizado sea capaz de introducir de manera satisfactoria al menos un gen en la célula huésped capaz de expresar el gen heterólogo.

**[0175]** Además, los constructos de ácido nucleico heterólogos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 se pueden transcribir *in vitro*, y el ARN resultante se puede introducir en la célula huésped mediante los métodos conocidos, por ejemplo, mediante inyección.

**[0176]** Se incluyen, además, transformantes nuevos y útiles de hongos filamentosos, tales como *H. jecorina* y *A. niger* para utilizarse en la producción de composiciones de celulasa fúngicas. La exposición incluye transformantes de hongos filamentosos, especialmente hongos que comprenden la secuencia que codifica la variante de CBH2, o la delección de la secuencia que codifica la *cbh* endógena.

**[0177]** Después de la introducción de un constructo de ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de codificación para una variante de *cbh2*, las células modificadas genéticamente se pueden cultivar en medios de nutrientes convencionales modificados según convenga para activar los promotores, seleccionar los

transformantes o aumentar la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de CBH2. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas anteriormente para la célula huésped seleccionada para la expresión, y resultarán evidente para los expertos en la materia.

5 [0178] Generalmente, se considera que la progenie de las células en las que se han introducido dichos constructos de ácidos nucleicos heterólogos comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la variante de CBH2 encontrada en el constructo de ácido nucleico heterólogo.

10 [0179] Se incluyen, además, transformantes nuevos y útiles de hongos filamentosos, tales como *H. jecorina* para utilizarse en la producción de composiciones de celulasa fúngicas. También se puede utilizar *Aspergillus niger* en la producción de la variante de CBH2. La exposición incluye transformantes de hongos filamentosos, especialmente hongos que comprenden la secuencia que codifica la variante de *cbh 2*, o la delección de la secuencia que codifica la *cbh2* endógena.

15 [0180] En general, se pueden diferenciar los transformantes estables de hongos filamentosos de los transformantes inestables por su índice de crecimiento más rápido y, en *Trichoderma*, por ejemplo, la formación de colonias circulares con un contorno liso en vez de irregular en el medio de cultivo sólido. De manera adicional, en algunos casos, se puede realizar una prueba adicional de estabilidad mediante el crecimiento de los transformantes en un medio sólido no selectivo, la recogida de esporas de este medio de cultivo y la determinación del porcentaje de estas esporas que germinarán posteriormente y crecerán en un medio selectivo.

#### VII. Análisis para secuencias codificantes de ácido nucleico de CBH2 y/o expresión de proteínas.

20 [0181] Con el fin de evaluar la expresión de una variante de CBH2 mediante una línea celular que ha sido transformada con un constructo de ácido nucleico que codifica una variante de CBH2, se pueden realizar ensayos a nivel de proteína, a nivel de ARN o mediante la utilización de bioensayos funcionales concretos con respecto a la actividad y/o la producción de celobiohidrolasa.

25 [0182] En una aplicación de ejemplo de las secuencias de ácido nucleico y de proteínas de la variante de *cbh2* descritas en el presente documento, se diseña una cepa modificada genéticamente de hongos filamentosos, por ejemplo, *Trichoderma reesei*, para producir una mayor cantidad de CBH2. Dichos hongos filamentosos genéticamente modificados serían útiles para producir un producto de celulasa con mayor capacidad celulolítica. En un enfoque, esto se consigue introduciendo la secuencia de codificación para *cbh2* en un huésped adecuado, por ejemplo, un hongo filamentoso, tal como *Aspergillus niger*.

30 [0183] Por consiguiente, se incluyen métodos para expresar la variante de CBH2 en un hongo filamentoso u otro huésped adecuado introduciendo un vector de expresión que contiene la secuencia de ADN que codifica la variante de CBH2 en las células del hongo filamentoso u otro huésped adecuado.

[0184] En otro aspecto, se incluyen métodos para modificar la expresión de CBH2 en un hongo filamentoso u otro huésped adecuado. Dicha modificación incluye una reducción o eliminación de la expresión de la CBH endógena.

35 [0185] En general, los ensayos empleados para analizar la expresión de la variante de CBH2 incluyen, la transferencia Northern, la transferencia puntual (análisis de ADN o ARN), RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda debidamente marcada (basada en la secuencia de codificación de ácido nucleico) y la transferencia Southern y autoradiografía convencionales.

40 [0186] Además, la producción y/o la expresión de la variante de CBH2 se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante ensayos para la actividad, expresión y/o producción de celobiohidrolasa. Dichos ensayos se describen, por ejemplo, en Karlsson, J. *et al.* (2001), *Eur. J. Biochem*, 268, 498-6507, Wood, T. (1988) en *Methods in Enzymology*, Vol. 160. *Biomass Part a Cellulose and Hemicellulose* (Wood, W. & Kellog, S. Eds.), pp. 19-25, Academic Press, San Diego, CA, USA) y, para el ensayo PAHBAH en (Lever, M. (1972) *Analytical Biochemistry*, 47, 273, Blakeney, A.B. & Mutton, L.L. (1980) *Journal of Science of Food and Agriculture*, 31, 889, Henry, R.J. (1984) *Journal of the Institute of Brewing*, 90, 37. Los sustratos útiles para los ensayos de las actividades de celobiohidrolasa, endoglucanasa o  $\beta$ -glucosidasa incluyen celulosa cristalina, papel de filtro, celulosa hinchada con ácido fosfórico, celooligosacáridos, metilumbeliferil lactósido, metilumbeliferil celobiosido, ortonitrofenil lactósido, paranitrofenil lactósido, ortonitrofenil celobiosido, paranitrophenyl celobiosido.

50 [0187] Además, la expresión de proteínas se puede evaluar mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células, secciones de tejido o inmunoensayo del medio de cultivo de tejidos, por ejemplo, mediante transferencia Western o ELISA. Dichos inmunoensayos se pueden utilizar para evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la expresión de una variante de CBH2. Los expertos en la materia conocen los detalles de tales métodos y muchos reactivos para practicar dichos métodos están disponibles comercialmente.

55 [0188] Se puede utilizar una forma purificada de una variante de CBH2 para producir anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para la proteína expresada para utilizarse en diferentes inmunoensayos. (Véase, por

ejemplo, Hu *et al.*, *Mol Cell Biol.* vol.11, n.º 11, pp. 5792-5799, 1991). Ejemplos de ensayos incluyen ELISA, inmunoensayos competitivos, radioinmunoensayos, transferencia Western, ensayos de inmunofluorescencia indirecta y similares. En general, se pueden utilizar anticuerpos y/o kits disponibles comercialmente para el inmunoensayo cuantitativo del nivel de expresión de las proteínas de celobiohidrolasa.

#### 5 VIII. Aislamiento y purificación de proteína CBH2 recombinante.

[0189] En general, una proteína de variante CBH2 producida en cultivo celular se secreta en el medio y se puede purificar o aislar, por ejemplo, eliminando los componentes no deseados del medio de cultivo celular. No obstante, en algunos casos, se puede producir una proteína de variante CBH2 en una forma celular que requiere la recuperación de un lisado celular. En tales casos, la proteína de variante CBH2 se purifica de las células en las que se produjo utilizando técnicas empleadas de forma rutinaria por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen, pero sin carácter limitativo, cromatografía de afinidad (Tilbeurgh *et al.*, *FEBS Lett.* 16:215, 1984), métodos cromatográficos de intercambio iónico (Goyal *et al.*, *Bioresource Technol.* 36:37-50, 1991; Fliess *et al.*, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17:314-318, 1983; Bhikhabhai *et al.*, *J. Appl. Biochem.* 6:336-345, 1984; Ellouz *et al.*, *J. Chromatography* 396:307-317, 1987), incluyendo intercambio iónico utilizando materiales con alto poder de resolución (Medve *et al.*, *J. Chromatography A* 808:153-165, 1998), cromatografía de interacción hidrofóbica (Tomaz y Queiroz, *J. Chromatography A* 865:123-128, 1999), y separación de dos fases (Brumbauer, *et al.*, *Bioseparation* 7:287-295, 1999).

[0190] Normalmente, la proteína de variante CBH2 se fracciona para segregar proteínas que tienen propiedades seleccionadas, tales como afinidad de unión a agentes de unión concretos, por ejemplo, anticuerpos o receptores; o que tienen un intervalo de peso molecular seleccionado, o un intervalo de puntos isoeléctricos.

[0191] Una vez se consigue la expresión de una proteína de variante CBH2 determinada, la proteína CBH2 producida de esta manera se purifica a partir de las células o cultivo celular. Ejemplos de procedimientos adecuados para tal purificación incluyen los siguientes: cromatografía en columna de afinidad de anticuerpos, cromatografía de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico, tal como, DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75. Se pueden emplear diferentes métodos de purificación de proteínas y tales métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, vol. 182, no. 57, pp. 779, 1990; Scopes, *Methods Enzymol.* 90: 479-91, 1982. La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y de la proteína concreta producida.

#### IX. Utilidad de *cbh2* y CBH2

[0192] Se puede entender que los ácidos nucleicos de la variante de *cbh*, la proteína de variante de CBH2 y las composiciones que comprenden actividad de proteína de variante de CBH2 resultan útiles en una amplia variedad de aplicaciones, algunas de las cuales se describen a continuación.

[0193] Las nuevas y mejoradas composiciones de celulasa que comprenden cantidades distintas de celulasas de tipo BG, de tipo EG y de tipo variante de CBH son útiles en composiciones detergentes que muestran capacidad de limpieza mejorada, funcionan como un agente suavizante y/o mejoran el tacto de los tejidos de algodón (por ejemplo, "lavado a la piedra" o "biopulido"), en las composiciones para degradar pulpa de madera en azúcares (por ejemplo, para la producción de bioetanol), y/o en composiciones para pienso. El aislamiento y caracterización de la celulasa de cada tipo proporciona la capacidad para controlar los aspectos de tales composiciones.

[0194] Las variantes (o mutantes) de CBH con termoestabilidad aumentada son útiles en todas las áreas anteriores debido a su capacidad para contener la actividad a temperaturas elevadas.

[0195] Las variantes (o mutantes) de CBH con termoestabilidad reducida son útiles, por ejemplo, en áreas en las que se requiere que la actividad enzimática sea neutralizada a temperaturas más bajas, de manera que otras enzimas que puedan estar presentes no se vean afectadas. Además, las enzimas pueden resultar útiles en la conversión limitada de celulósicos, por ejemplo, en el control del grado de cristalinidad o de la longitud de cadena celulósica. Después de alcanzar el grado de conversión deseado, se puede elevar la temperatura de sacarificación por encima de la temperatura de supervivencia de la CBH desestabilizada. Puesto que la actividad de CBH es esencial para la hidrólisis de la celulosa cristalina, la conversión de celulosa cristalina cesará a la temperatura elevada.

[0196] En un enfoque, la celulasa es útil en composiciones detergentes o en el tratamiento de tejidos para mejorar el tacto y la apariencia.

[0197] Puesto que la velocidad de hidrólisis de los productos celulósicos se puede aumentar utilizando un transformante que tenga al menos una copia adicional del gen *cbh* insertado en el genoma, los productos que contienen celulosa o heteroglicanos se pueden degradar a un ritmo más rápido y en mayor medida. Los

productos fabricados con celulosa, tales como papel, algodón, pañales de celulosa, y similares se pueden degradar de manera más eficiente en un vertedero. De esta manera, el producto de la fermentación obtenible de los transformantes o los transformantes solos se puede utilizar en composiciones para ayudar a degradar mediante licuefacción una variedad de productos de celulosa que se añaden a los vertederos llenos.

5 **[0198]** La sacarificación y fermentación por separado es un proceso por el que la celulosa presente en la biomasa, por ejemplo, rastrojos de maíz, se convierte en glucosa y, posteriormente, las cepas de levadura convierten la glucosa en etanol. La sacarificación y fermentación simultánea es un proceso por el que la celulosa presente en la biomasa, por ejemplo, rastrojos de maíz, se convierte en glucosa y, al mismo tiempo y en el mismo reactor, las cepas de levadura convierten la glucosa en etanol. De esta manera, en otro enfoque, la variante de celulosa de tipo CBH resulta útil en la degradación de la biomasa en etanol. La producción de etanol a partir de fuentes de celulosa fácilmente disponibles proporciona una fuente de combustible renovable estable.

10 **[0199]** Las materias primas basadas en celulosa están compuestas de residuos agrícolas, pastos y maderas y otra biomasa de bajo valor, tal como residuos municipales (por ejemplo, papel reciclado, hierba cortada, etc.). El etanol se puede producir a partir de la fermentación de cualquiera de estas materias primas celulósicas. No obstante, la celulosa debe convertirse primero en azúcares antes de que pueda haber una conversión en etanol.

15 **[0200]** Se pueden utilizar una gran variedad de materias primas con la variante de CBH y la seleccionada para su uso puede depender de la región en la que se realiza la conversión. Por ejemplo, en el medio oeste de Estados Unidos pueden predominar residuos agrícolas tales como paja de trigo, rastrojo de maíz y bagazo, mientras que en California puede predominar la paja de arroz. No obstante, debe entenderse que se puede utilizar cualquier biomasa celulósica disponible en cualquier región.

20 **[0201]** Una composición de celulosa que contiene una cantidad mejorada de celobiohidrolasa resulta útil en la producción de etanol. El etanol de este proceso también se puede utilizar como un potenciador de octanaje o directamente como combustible en lugar de la gasolina, lo cual es ventajoso puesto que el etanol como fuente de combustible es más ecológico que los productos derivados del petróleo. Se sabe que la utilización de etanol mejorará la calidad del aire y posiblemente reducirá los niveles locales de ozono y smog. Además, la utilización de etanol en lugar de gasolina puede ser de importancia estratégica en la amortiguación del impacto de los cambios repentinos en la energía no renovable y los suministros petroquímicos.

25 **[0202]** El etanol se puede producir a través de procesos de sacarificación y fermentación a partir de biomasa celulósica, tal como árboles, plantas herbáceas, residuos sólidos municipales y residuos agrícolas y forestales. No obstante, el índice de enzimas de celulosa individuales en una mezcla de celulasas de origen natural producida mediante un microbio puede no ser la más eficaz para la conversión rápida de la celulosa de la biomasa en glucosa. Se sabe que las endoglucanasas actúan para producir nuevos extremos en la cadena de celulosa que por sí mismos son sustratos para la acción de celobiohidrolasas y mejoran, de esta manera, la eficacia de la hidrólisis del sistema de celulasas entero. Por lo tanto, la utilización de actividad de celobiohidrolasa aumentada u optimizada puede mejorar en gran medida la producción de etanol.

30 **[0203]** De esta manera, la celobiohidrolasa resulta útil en la hidrólisis de celulosa en sus componentes de azúcar. En un modo de realización, se añade una variante de celobiohidrolasa a la biomasa antes de la adición de un organismo fermentador. En un segundo modo de realización, se añade una variante de celobiohidrolasa a la biomasa al mismo tiempo que un organismo fermentador. De manera opcional, puede haber otros componentes de celulosa presentes en cualquier modo de realización.

35 **[0204]** En otro modo de realización, la materia prima celulósica se puede pretratar. El pretratamiento puede ser mediante temperatura elevada y la adición de ácido diluido, ácido concentrado o una solución de álcali diluido. La solución de pretratamiento se añade durante un tiempo suficiente para hidrolizar al menos parcialmente los componentes de la hemicelulosa y después neutralizarlos.

45 **[0205]** El producto principal de la acción de CBH2 en la celulosa es la celobiosa, que está disponible para la conversión en glucosa mediante la actividad de BG (por ejemplo, en un producto de celulosa fúngica). Ya sea mediante el pretratamiento de la biomasa celulósica o mediante la acción enzimática en la biomasa, otros azúcares, además de la glucosa y la celobiosa, pueden estar disponibles a partir de la biomasa. El contenido de hemicelulosa de la biomasa se puede convertir (mediante hemicelulasas) en azúcares, tales como xilosa, galactosa, manosa y arabinosa. De esta manera, en un proceso de conversión de biomasa, la sacarificación enzimática puede producir azúcares que están disponibles para conversiones biológicas o químicas en otros intermedios o productos finales. Por lo tanto, los azúcares generados a partir de la biomasa son útiles en una variedad de procesos, además de la generación de etanol. Ejemplos de dichas conversiones son la fermentación de glucosa en etanol (como lo analiza M.E. Himmel *et al.* pp 2-45, en "Fuels and Chemicals from Biomass", ACS Symposium Series 666, ed B.C. Saha y J. Woodward, 1997) y otras conversiones biológicas de glucosa en 2,5-diceto-D-gluconato (patente estadounidense n.º 6.599.722), ácido láctico (R. Datta y S-P. Tsai pp 224-236, *ibid*), succinato (R.R. Gokam, M.A. Eiteman y J. Sridhar pp237-263, *ibid*), 1,3-propanodiol (A-P. Zheng, H. Biebl y W-D. Deckwer pp 264-279, *ibid*), 2,3-butanodiol (C.S. Gong, N. Cao y G.T. Tsao pp. 280-293, *ibid*), y las conversiones

químicas y biológicas de xilosa en xilitol (B.C. Saha y R.J. Bothast pp 307-319, *ibid*). Véase también, por ejemplo, WO 98/21339.

- 5 **[0206]** Las composiciones detergentes pueden emplear, además de la composición de celulasas (independientemente del contenido de celobiohidrolasa, es decir celobiohidrolasa libre, celobiohidrolasa sustancialmente libre, o celobiohidrolasa mejorada), un surfactante, incluyendo surfactantes aniónicos, no iónicos y anfólicos, una hidrolasa, agentes mejoradores, agentes blanqueadores, agentes azulantes y tintes fluorescentes, inhibidores del apelmazamiento, solubilizantes, surfactantes catiónicos y similares. Todos estos componentes se conocen en el sector de los detergentes. La composición de celulasa como se describe anteriormente se puede añadir a la composición detergente ya sea en un diluyente líquido, en gránulos, en emulsiones, en geles, en pastas y similares. El experto en la materia conoce bien dichas formas. Cuando se emplea una composición detergente sólida, la composición de celulasas se formula preferiblemente en forma de gránulos. Preferiblemente, los gránulos se pueden formular de manera que contengan un agente protector de celulasa. Para una exposición más completa, véase la patente estadounidense número 6.162.782 titulada "Detergent compositions containing cellulase compositions deficient in CBH2 type components."
- 10
- 15 **[0207]** Preferiblemente, las composiciones de celulasas se emplean desde aproximadamente 0,00005 por ciento en peso hasta aproximadamente 5 por ciento en peso en relación con la composición detergente total. Más preferiblemente, las composiciones de celulasas se emplean desde aproximadamente 0,0002 por ciento en peso hasta aproximadamente 2 por ciento en peso en relación con la composición detergente total.

- 20 **[0208]** Además, la secuencia de ácidos nucleicos de la variante de CBH2 resulta útil en la identificación y caracterización de secuencias de ácido nucleico relacionadas. Varias técnicas útiles para determinar (predecir o confirmar) la función de los genes o productos génicos relacionados incluyen, pero sin carácter limitativo, (A) análisis de ADN/ARN, tal como (1) sobreexpresión, expresión ectópica, y expresión en otras especies; (2) bloqueo de genes (genética inversa, bloqueo dirigido, silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés, véase Baulcombe, *100 Years of Virology*, Calisher y Horzinek eds., Springer-Verlag, New York, NY 15:189-201, 1999); (3) análisis del estado de metilación del gen, especialmente las regiones reguladoras flanqueantes; y (4) hibridación *in situ*; (B) análisis de producto génico, tal como (1) expresión de proteína recombinante; (2) producción de antisueros, (3) inmunolocalización; (4) ensayos bioquímicos para actividad catalítica u otra actividad; (5) estado de fosforilación; y (6) interacción con otras proteínas a través de análisis de dos híbridos de levadura; (C) análisis de sistema, tal como colocar un gen o producto génico en el interior de un sistema bioquímico o de transducción de señales concreto basado en su fenotipo de sobreexpresión o mediante homología de secuencia con genes relacionados; y (D) otros análisis que también se pueden llevar a cabo para determinar o confirmar la participación del gen aislado y su producto en un sistema metabólico o de transducción de señales concreto, y ayudar a determinar la función del gen.
- 25
- 30

## EJEMPLOS

- 35 **[0209]** La presente descripción se describe con más detalle en los siguientes ejemplos que de ningún modo pretenden limitar el alcance. Las Figuras adjuntas deben considerarse como partes integrales de la memoria y la descripción de la exposición.

### EJEMPLO 1

#### Alineamiento de celulasas Cel6A conocidas

- 40 **[0210]** La elección de varias de las mutaciones se determinó alineando primero Cel6A de *Hypocrea jecorina* a ocho (8) miembros de la familia utilizando información estructural y un programa de modelado. La Figura 3 muestra el alineamiento de moléculas de CBH2 derivadas de *Humicola insolens* (Q9C1S9), *Acremonium cellulolyticus* (O93837), *Agaricus bisporus* (P49075), *Hypocrea koningii* (AF315681), *Phanerochaete chrysosporium* (S76141), *Talaromyces emersonii* (Q8N1B5), *Lentinula edodes* (AF244369), *Hypocrea jecorina* (P07987). Las alineaciones se realizaron mediante Clustal W con una penalización de espació de 10 utilizando el programa de software Vector NTI Suite.
- 45

- 50 **[0211]** Basándose en los alineamientos, se realizaron varias mutaciones de aminoácidos individuales y múltiples en la proteína mediante mutagénesis de sitio. Se identificaron las posibles mutaciones que podrían mejorar la termoestabilidad de la enzima utilizando la secuencia consenso. Véase la Figura 3. Se realizó una inspección visual de la estructura en 3D para comprobar su compatibilidad con la estructura. Todos los cambios, que no cabían en la molécula de CBH2 por razones estéricas o que estaban muy cerca del sitio activo, se omitieron del conjunto de mutaciones iniciales.

- 55 **[0212]** La secuencia consenso para CBH2 se determinó alineando secuencias de CBH2 como se describe en el presente documento. El alineamiento de la Figura 3 sirvió como base para la determinación de la así denominada secuencia consenso. La secuencia consenso de un alineamiento es la secuencia, que tiene en cada posición el aminoácido, que se encuentra en la mayoría de las secuencias de aminoácidos, que se utilizaron para construir el alineamiento. Esas posiciones en las que la secuencia consenso se desvió de la secuencia de

aminoácidos de CBH2 de *T. reesei* se evaluaron examinando la estructura en 3D de la proteína (código PDB 1QK2). La inspección gráfica se realizó utilizando el programa informático BRAGI (D. Schomburg, J. Reichelt, *J. Mol. Graphics*, Vol 6, 161-165 (1988)) en un ordenador Indigo2 Solid Impact de Silicon Graphics. Aquellas mutaciones que, de conformidad con el modelo 3D, cabían en la estructura sin perturbación y era probable que mejoraran la termoestabilidad de la enzima se seleccionaron como reemplazo para la termoestabilidad mejorada de CBH2 de *H. jecorina*. En algunos casos, la inspección visual de la estructura en 3D de la molécula de CBH2 hizo necesario reemplazar un residuo no conservado de CBH2 de *H. jecorina* por otro aminoácido que sugirió el alineamiento de secuencia. En algunos casos, el aminoácido está glicosilado en la estructura en 3D. Las posiciones glicosiladas, que se investigaron basándose en el alineamiento, son S109 y N310. Estas posiciones no se cambiaron. En la posición V94, la valina se reemplazó por un residuo de ácido glutámico, ya que podría tener interacciones de carga estabilizante con una o dos argininas en la posición 213 y/o 237. En la posición T142 se decidió introducir una prolina, que podría caber de conformidad con el alineamiento de secuencia. Este aminoácido se encuentra en muchas de las secuencias alineadas y puede estabilizar debido al efecto entrópico de la prolina. En la posición L179 se decidió probar el efecto de una introducción de una alanina, que es el único aminoácido alternativo en las moléculas de CBH2 en este alineamiento. En la posición Q204, se decidió reemplazar la glutamina por un residuo de ácido glutámico y no por alanina, como sugirió la secuencia consenso, puesto que la introducción de la alanina podría destruir las interacciones favorables en el núcleo hidrofóbico, mientras que la introducción de una carga a través de la mutación Q a E debería mejorar la red de carga en la superficie de la molécula. Se reemplazó V206 por leucina, porque parece que cabe mejor en el núcleo hidrofóbico que la isoleucina. En el caso de V250, se decidió reemplazarla por leucina y no por la isoleucina ligeramente mayor debido a limitaciones de espacio. En la posición N285, se investigó la influencia de la longitud de la cadena lateral en la estabilidad reemplazando la asparagina por glutamina. En la posición S291, se decidió analizar el efecto de una introducción de una glicina, que es el único aminoácido alternativo en las moléculas de CBH2 en este alineamiento. En la posición S316, se decidió analizar el efecto de una introducción de una prolina, que es el único aminoácido alternativo en las moléculas de CBH2 en este alineamiento. En la posición S343, se decidió introducir una prolina debido a su efecto estabilizador en el esqueleto y al hecho de que este aminoácido es el más frecuente en esta posición en el alineamiento. En la posición T349, se reemplazó la treonina por una leucina y no por valina como sugirió la secuencia consenso. En la posición S413, se decidió analizar el efecto de un residuo aromático en la estabilidad en esta posición reemplazando la serina por tirosina.

## 30 EJEMPLO 2

### Preparación de constructos de *cbh2*

[0213] La secuencia de ADNc de CBh2 presentada en la Figura 2 sirvió como plantilla para amplificar el gen. También sirvió como plantilla para la introducción de mutaciones.

35 [0214] Los siguientes cebadores de ADN se construyeron para utilizarse en la amplificación de genes *cbh2* mutantes a partir de ADN genómico aislado de diversos microorganismos. Todos los símbolos utilizados en el presente documento para secuencias de ADN y proteína corresponden a los códigos de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

40 [0215] Los cebadores homólogos 5' (FRG361) y 3' (FRG362) se desarrollaron basándose en la secuencia de *cbh2* de *Trichoderma reesei*. Ambos cebadores contenían secuencias de clonación Gateway de Invitrogen® en el extremo 5' del cebador. El cebador 361 contenía la secuencia attB1 y el cebador FRG362 contenía la secuencia attB2.

Secuencia de FRG361 sin la attB1:

ATGATTGTCGGCATTCTCAC (esto ceba el extremo 5' del gen, que codifica la secuencia señal de CBH2 de *H. jecorina*) (SEQ ID NO: 3)

45 Secuencia de FRG362 sin la attB2:

TTACAGGAACGATGGGTTTGCG (esto ceba el extremo 3' del gen que codifica el dominio catalítico de CBH2 de *H. jecorina*) (SEQ ID NO: 4)

50 [0216] El ADNc de *cbh2* de *H. jecorina* sirvió como plantilla. El ADNc utilizado se derivó de una genoteca de ADNc preparada como se describe en Pamela K. Foreman *et al*, *Journal of Biological Chemistry* Vol 278 n.º 34 2003 página 31989. La genoteca se cribó con una sonda de dominio catalítico de CBH2 específico utilizando cebadores:

**Tabla 1**

cbh2	directo	FRG170	ACG TAT TCA GGC AAC CC
	inverso	FRG171	G CA GTG G CC ATG GCT CC

5 [0217] Las condiciones de PCR fueron como sigue: 10 µL de tampón de reacción 10X (tampón de reacción 10X que comprende 100 mM de Tris HCl, pH 8-8.5; 250 mM de KCl; 50 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,2 mM de cada uno de dATP, dTTP, dGTP, dCTP (concentración final), 1 µL de 100 ng/µL de ADN genómico, 0,5 µL de polimerasa PWO (Boehringer Mannheim, Cat # 1644-947) a 1 unidad por µL, 0,2 µM de cada cebador, FRG361 y FRG362, (concentración final), 4 µl de DMSO y agua a 100 µL.

[0218] Los fragmentos que codifican las variantes se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el KIT de extracción en gel de Qiagen. Los fragmentos purificados se utilizaron para realizar una reacción de clonasa con el vector pDONR™201 de Invitrogen® utilizando el manual de instrucciones de Tecnología Gateway™ (versión C) de Invitrogen®. El clon pENTRYCBH2 preparado de esta manera se proporciona en la figura 4.

10 [0219] Diversos sitios en CBH2 de *H. jecorina* pueden estar implicados en la termoestabilidad de las variantes y el gen *cbh2* de *H. jecorina* se sometió, por tanto, a mutagénesis utilizando los cebadores y los reactivos de reacción descritos a continuación.

[0220] Los parámetros de ciclo para cada reacción (mutagénesis de sitio único, mutagénesis al azar, mutagénesis regional o combinatoria) fueron los mismos:

15

**Tabla 2**

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95° C	1 minuto
2	30	95° C	1 minuto
		55° C	1 minuto
		65° C	12 minutos
3	1	4° C	2 minutos

[0221] Los productos de amplificación se aislaron y se caracterizaron como se describe a continuación (véanse los Ejemplos 3-6).

[0222] Los genes (variantes o naturales) que tenían la secuencia correcta se transfirieron entonces desde este vector ENTRY al vector de destino (pRAXdes2) para obtener el vector de expresión pRAXdesCBH2.

20 [0223] Las células se transformaron con un vector de expresión que comprendía un ácido nucleico que codificaba la variante de celulasa CBH2. Los constructos se transformaron en *A. niger var. awamori* de conformidad con el método descrito por Cao *et al* (Cao Q-N, Stubbs M, Ngo KQP, Ward M, Cunningham A, Pai EF, Tu G-C y Hofmann T (2000) Penicillopepsin-JT2 a recombinant enzyme from *Penicillium janthinellum* and contribution of a hydrogen bond in subsite S3 to kcat Protein Science 9:991-1001).

25 **EJEMPLO 3**

**Mutagénesis de sitio dirigido**

[0224] Basándose en las explicaciones anteriores presentadas en el Ejemplo 1, se realizaron mutantes de CBH2 de sitio dirigido con los siguientes cebadores 5' fosforilados que se desarrollaron y se sintetizaron utilizando técnicas bien conocidas en la técnica:

30

**Tabla 3: Cebadores para mutantes de sitio dirigido único**

mutación	Cebador	bps	SEQ ID NO.
V94E	CAGGCAACCCTTTT <b>GA</b> AGGGGTCACTCCTTGG CG	34	
P98L	CAACCCTTTTGTGGGGTCACT <b>CTT</b> TGGGCCAA TGC	36	
G118P	GCTATTCTAGCTTGACT <b>CC</b> AGCCATGGCCACT GCTG	37	
M120L	TCCTAGCTTGACTGGAGCC <b>CTG</b> GCCACTGCTG C	33	
M134V	GCTGTGCGAAAGGTTCCCTCTTT <b>TGT</b> GTGGCTA GATACTCTTG	43	
T142V	GATACTCTTGACAAG <b>GTCC</b> CTCTCATGGAGCAA ACCTTGGCC	42	
M145L	CAAGACCCCTCTC <b>CTG</b> GAGCAAACCTTGGCCG AC	34	
T148Y	GACCCCTCTCATGGAGCA <b>ATACT</b> TGGCCGACAT CCG	36	

ES 2 554 467 T3

mutación	Cebador	bps	SEQ ID NO.
T154A	CGACATCCGC <b>GCC</b> GCCAACAAGAATGGCGG	30	
L179A	CGATTGCGCTGCC <b>GCT</b> GCCTCGAATGGCG	29	
Q204E	CGACACCATT <b>CGT</b> <b>GAA</b> ATTGTCGTGGAATATTC CGATATCCG	42	
V206L	CGACACCATT <b>CGT</b> CAAATT <b>CTC</b> GTGGAATATTC CGATATCCG	42	
I212V	GAATATTCCGAT <b>GTC</b> CGGACCCTCCTGGTTATT GAGCCTG	40	
L215I	GGAATATTCCGATATCCGGACC <b>ATC</b> CTGGTTAT TGAGCCTGAC	43	
G231 N	CTGGTGACCAACCT <b>CA</b> ATACTCCAAAGTGTGCC AATGCTCAG	42	
T232V	GACCAACCTCGGT <b>GTT</b> CCAAAGTGTGCCAATGC TCAG	37	
V250I	TGAGTGCATCAACTACGCC <b>ATC</b> ACACAGCTGAA CCTTCC	39	
Q276L	CCGGCAAAC <b>CT</b> AGACCCGGCCGCTCAGCTATT TG	34	
N285Q	GGCCGCTCAGCTATTTGC <b>ACA</b> AGTTTACAAGAA TGCATCG	40	
S291G	GTTTACAAGAATGC <b>AGG</b> TCTCCGAGAGCTCTT CGCGG	38	
G308A	GTCGCCAACTACAAC <b>GCG</b> TGGAACATTACCAG CCC	35	
T312S	CAACGGGTGGAACATT <b>AGC</b> AGCCCCCATCGT AC	34	
S316P	CATTACCAGCCCCCA <b>CCG</b> TACACGCAAGGC	31	
V323N	CAAGGCAACGCT <b>AACT</b> ACAACGAGAAGCTGTA CATCCACGC	41	
N325D	CAAGGCAACGCTGTCTAC <b>GAC</b> GAGAAGCTGTA CATCCAC	39	
I333L	GCTGTACATCCACGCT <b>CTT</b> GGACCTCTTCTTGC CAATCAC	40	
G334A	TACATCCACGCTATT <b>GCA</b> CCTCTTCTTGCCAAT CACGG	38	
S343P	CCAATCACGGCTGG <b>CCA</b> ACGCCTTCTTCATC	32	
T349L	CAACGCCTTCTTCAT <b>CCTT</b> GATCAAGGTCGATC GGGAAAG	40	
G360R	GAAAGCAGCCTACC <b>AGAC</b> AGCAACAGTGGGGA GACTGG	38	
S380T	GGTATTCGCCCA <b>ACC</b> GCAACACTGGGGACTC G	33	
A381T	GGTATTCGCCCATCC <b>ACA</b> AACACTGGGGACTC GTTG	36	
S386P	GACTCGTTGCTGGAT <b>GCG</b> TTTGTCTGGGTCAAG CC	35	
F411Y	AGTGCGCCACGAT <b>TAT</b> GACTCCCCTGTGCGCT C	33	
S413Y	GCCACGATTTGACT <b>TACC</b> ACTGTGCGCTCCCAG ATG	35	
A416G	TTTGACTCCCCTGT <b>GGG</b> CTCCCAGATGCCTTG	33	
Q426E	CAACCGGCCT <b>GAA</b> GCTGGTGGTTGGTTC	30	
A429T	GCGCCTCAAGCTGGT <b>ACTT</b> GGTTCCAAGCCTA CTTTGTG	39	

[0225] Los codones que codifican la mutación están subrayados y en negrita.

[0226] Para desarrollar los mutantes de sitio dirigido se utilizó el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA; Cat # 200513).

[0227] La reacción de mutagénesis se llevó a cabo utilizando los siguientes reactivos de reacción:

**Tabla 4**

componente	concentración	cantidad
Cebador fosforilado (de la Tabla 2, arriba)	100 µM	1 µl
pEntryCBH2	50 ng/µl	1 µl
dNTP's	10 mM	1 µl
Tampón 10*QC	Stratagene	2,5 µl
Enzima QC	Stratagene	1 µl
Agua MilliQ estéril		18,5 µl

[0228] Los productos de amplificación se recuperaron (se purificaron de cebadores, nucleótidos, enzimas, aceite mineral, sales y otras impurezas) y se digirieron con *Dpn* I. Se añadió un microlitro de *Dpn* I (10 U/µl) a la mezcla de PCR y se incubó a 37 °C durante 90 min. Los productos de reacción de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (250) (Qiagen, Cat. n.º 28106) de conformidad con las instrucciones del fabricante. El volumen de elución fue de 35 µl de tampón de elución.

[0229] Para eliminar el ADN bicatenario no mutado, la muestra eluida se digirió una segunda vez con la enzima de restricción *Dpn* I. Se añadieron a la muestra 1 µl de *Dpn* I de Invitrogen (Cat. n.º 15242-019) y 4 µl de tampón de reacción (el reactivo 4 se suministró con *Dpn* I como una solución 10X; se diluyó 1:10 en la mezcla de reacción final) y se incubó a 37 °C durante 90 minutos. Se utilizaron dos microlitros de la muestra de reacción para la transformación de 10 µl de células electro competentes One-Shot Top10 (Invitrogen, Cat. n.º C4040-50). Después de 1 hora de crecimiento a 37 °C en el medio SOC (Véase Hanahan (1983) *J. Mol. Biol.* 166:557-580), las células se colocaron en placas de kanamicina selectivas, y se incubaron a 37 °C durante la noche.

[0230] Se cultivaron los clones positivos en el medio 2\*TY con 100 µg/ml de ampicilina, y se aisló ADN plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep (Cat. n.º 27106). Los plásmidos se secuenciaron para confirmar que la secuencia de mutación se había incorporado correctamente.

[0231] Los mutantes con la secuencia correcta se transfirieron al vector de expresión pRAXdest#2 de *A. niger* con la reacción LR, de conformidad con el procedimiento de clonación Gateway (Invitrogen; Cat. n.º 11791019). Después de la transformación de los protoplastos de los clones de expresión a *A. niger* AP4, los mutantes de sitio dirigido (SDM, por sus siglas en inglés) se cribaron para termoestabilidad alterada (Tabla 14).

#### EJEMPLO 4

##### Genotecas combinatorias

[0232] Se desarrollaron dos genotecas QuikChange (QC2C y QC2D), basándose en los resultados para las mutaciones de sitio único que se identificaron durante el cribado de los SDM: 98, 134, 206, 212, 312, 316, 411 y 413.

[0233] Las mutaciones P98L, M134V, V206L, I212V, T312S, S316P, F411Y y S413Y se combinaron aleatoriamente en genotecas utilizando el método quick-change (QC). Para desarrollar las genotecas QC se utilizó el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios (Cat # 200513 de Stratagene).

[0234] Los cebadores se prepararon como se enumera en la tabla que aparece a continuación:

**Tabla 5**

Nombre	Cebador
98FP	CAACCCTTTTGTGGGGTCACTCTTTGGGCAATGC
134 FP	GCTGTCGCAAAGGTTCCCTCTTTGTGTGGCTAGATACTCTTG
206 FP	CGACACCATTTCGTCAAATTCTCGTGGAATATTCCGATATCCG
212 FP	GAATATTCCGATGTCCGGACCCTCCTGGTTATTGAGCCTG
206/212 FP	CGTCAAATTCTCGTGGAATATTCCGATGTCCGGACCCTCC
312 FP	CAACGGGTGGAACATTAGCAGCCCCCATCGTAC
316 FP	CATTACCAGCCCCCACCGTACACGCAAGGC
312/316 FP	GGTGAACATTAGCAGCCCCCACCGTACACGCAAGGC
411 FP	AGTGCGCCACGATATGACTCCCCTGTGCGCTC
413 FP	GCCACGATTTGACTACCACTGTGCGCTCCCAGATG
411/413 FP	GTGCGCCACGATATGACTACCACTGTGCGCTCCCAGATG

[0235] Se preparó una mezcla de cebadores como sigue:

[0236] Se mezclaron treinta microlitros de cebadores 98 y 134 (véase la tabla anterior) con los 10 µl de cada uno de los otros cebadores (véase la tabla anterior). Se analizaron dos concentraciones de cebadores diferentes dando lugar a dos genotecas de las cuales una contenía un promedio de 2 sustituciones de aminoácidos y la segunda 6 sustituciones de aminoácidos por molécula.

5 [0237] La reacción de mutagénesis se llevó a cabo utilizando los siguientes reactivos de reacción:

Tabla 6

componente	concentración	QC2C	QC2D
Mezcla de cebadores fosforilados	10 µM	1 µl	10
pEntryCBH2	250 ng/µl	1 µl	1 µl
dNTP's	10 mM	1 µl	1 µl
Tampón 10 * QC	Stratagene	2,5 µl	2,5 µl
Enzima QC	Stratagene	1 µl	1 µl
Agua MilliQ estéril		18,5 µl	9,5 µl

[0238] Los productos de amplificación se digirieron con Dpn I. Se añadió 1 µl de DpnI (10 U/µl) a la mezcla de PCR y se incubó a 37 °C durante 90 min. Los productos de reacción de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (250) (Qiagen, Cat. n.º 28106) de conformidad con las instrucciones del fabricante. El volumen de elución fue de 35 µl de tampón de elución.

10

[0239] Para eliminar el ADN bicatenario no mutado, la muestra eluida se digirió una segunda vez con la enzima de restricción Dpn I. Se añadieron a la muestra 1 µl de Dpn I de Invitrogen (Cat. n.º 15242-019) y 4 µl de tampón de reacción (el reactivo 4 se suministró con Dpn I como una solución 10X; se diluyó 1:10 en la mezcla de reacción final) y se incubó a 37 °C durante 90 minutos. Se utilizaron dos microlitros de la muestra de reacción para la transformación de 10 µl de células electro competentes One-Shot Top10 (Invitrogen, Cat. n.º C4040-50). Después de 1 hora de crecimiento a 37 °C en el medio SOC (Véase Hanahan (1983) *J. Mol. Biol.* 166:557-580), las células se colocaron en placas de kanamicina selectivas, y se incubaron a 37 °C durante la noche.

15

[0240] Se cultivaron los clones positivos en el medio 2\*TY con 100 µg/ml de ampicilina, y se aisló ADN plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep (Cat. n.º 27106). Los plásmidos se secuenciaron para confirmar que la secuencia de mutación se había incorporado correctamente.

20

[0241] Los mutantes con la secuencia correcta se transfirieron al vector de expresión pRAXdest#2 de *A. niger* con la reacción LR, de conformidad con el procedimiento de clonación Gateway (Invitrogen; Cat. n.º 11791019). Después de la transformación de protoplastos de los clones de expresión a *A. niger* AP4, las genotecas QC se cribaron para termoestabilidad alterada (Tablas 15, 16).

25

## EJEMPLO 5

### Mutagénesis regional

[0242] Como se describe a continuación, basándose en los resultados para las mutaciones de sitio único que se identificaron durante el cribado de los SDM, se identificaron regiones en la estructura en 3D de CBH2, mutadas al azar y cribadas en un ensayo de termoestabilidad. Los aminoácidos, que constituyen tal región espacial son (en grupos): [210, 214], [253, 255, 257, 258], [411, 413, 415], [412, 414, 416], [312, 313], 323, [212, 149, 152], [134, 144] y 98.

30

[0243] Se cribaron las genotecas completamente aleatorizadas en las posiciones anteriores (es decir, [210, 214], [253,255, 257, 258], [411, 413, 415], [412, 414, 416], [312, 313], 323, [212, 149, 152], [134, 144] y 98). Los aminoácidos de la lista anterior que están entre corchetes (por ejemplo, [210, 214]) se aleatorizaron conjuntamente, los aminoácidos 323 y 98 se aleatorizaron solos. Las variantes CBH2-S316P o CBH2-V206L-S316P sirvieron como el esqueleto para estas genotecas.

35

[0244] Los cebadores NNS se construyeron y se ordenaron de Invitrogen:

Tabla 7

Número RL	Sitios	Cebadores
1	210/214 directo	CGTCAAATTCTCGTGGAAATNNSGATATCCGGNNSCTC CTGGTTATTG
	210/214 inverso	CAATAACCAGGAGSNNCCGGATATCSNNATATTCCACGA GAATTTGACG
2	253/255/257/258 dir.	GTCACACAGNNSAACNNSCCANNNSNNSGCGATGTATTTG

Número RL	Sitios	Cebadores
	253/255/257/258 inv.	CAAATACATCGCSNNSNNTGGSNNGTTSNNCTGTGTGAC
3	411/413/415 dir.	GCGCCACGANNSGACNNSCACNNSGCGCTCCCAGATGC C
	411/413/415 inv.	GGCATCTGGGAGCGCSNNGTGSNNGTCSNNTCGTGGCG C
4	412/414/416 dir.	GCGCCACGATTTNNSTCCNNSTGTNNSCTCCCAGATGCC TTG
	412/414/416 inv.	CAAGGCATCTGGGAGSNNACASNNGGASNNAAATCGTG GCGC
5	312/313 dir.	CAACGGGTGGAACATTNNSNNSCCCCACCGTACACGC AAGGC
	312/313 inv.	GCCTTGCGTGTACGGTGGGGGSNNSNNAATGTTCCACC CGTTG
6	323 dir.	CCCCACCGTACACGCAAGGCAACGCTNNSTACAACGA GAAG
	323 inv.	CTTCTCGTTGTASNAGCGTTGCCTTGCGTGTACGGTGG GGG
7	212 dir.	GAATATTCCGATNNSCGGACCCTCCTGGTTATTGAGCCT G
	212 inv.	CAGGCTCAATAACCAGGAGGGTCCGSNNATCGGAATATT C
	149/152 dir.	CCTTCATGGAGCAAACCNNSGCCGACNNSCGCACCGC C
	149/152 inv.	GGCGGTGCGSNNGTCCGGCSNNGGTTTGCTCCATGAGAG G
8	134/144 dir.	CCCTCTTTTNNSTGGCTAGATACTCTTGACAAGACCCCTN NSATGGAGCAAACC
	134/144 inv.	GGTTTGCTCCATSNNAGGGGTCTTGCAAGAGTATCTAG CCASNAAAAGAGGG
9	98 dir.	CAACCCTTTTGTTGGGGTCACTNNSTGGGCCAATGC
	98 inv.	GCATTGGCCASNNAGTGACCCCAACAAAAGGGTTG

[0245] La PCR se realizó de conformidad con el siguiente protocolo, con ADN polimerasa Pfu Ultra (Stratagene; Cat. n.º 600380):

**Tabla 8**

componente	concentración	cantidad
Cebador directo	10 µM	2 µl
Cebador inverso	10 µM	2 µl
Secuencia esqueleto	-	1 µl
dNTP's	10 mM	1 µl
Tampón 10 * Pfu	Stratagene	5 µl
Enzima Pfu Ultra	Stratagene	0,5 µl
DMSO	-	2 µl
Agua MilliQ estéril		36,5 µl

5 [0246] Los fragmentos de PCR se colocaron en un gel LMT al 1 %, y se purificaron con un kit de extracción en gel de Qiagen (Stratagene Cat. n.º 28706). Los fragmentos purificados se fusionaron con Pfu Ultra (véase arriba) y los cebadores de *cbh2* con secuencias attB flanqueantes.

10 [0247] Los genes *cbh2* purificados se transfirieron al vector Entry Gateway pDON201 con la reacción BP, de conformidad con el manual (Invitrogen; Cat. n.º 11789013). Los clones positivos se seleccionaron en placas 2\*TY con kanamicina. (50 µg/ml), y las placas se rasparon para preparar los plásmidos para la transferencia a pRAXdest#2 (vector de expresión), con la reacción LR Gateway (Invitrogen; Cat. n.º 11791019). Este vector se digirió con NotI, para optimizar la frecuencia de transformación de la reacción LR. La transformación de protoplastos se ha utilizado para crear 9 genotecas regionales de CBH2 en *A. niger* AP4 que se cribaron para termoestabilidad alterada (Tabla 17).

**EJEMPLO 6**

**Mutantes múltiples**

[0248] Basándose en los resultados de expresión y termoestabilidad de las mutaciones de sitio único, se diseñó un conjunto de mutantes múltiples, que se produjeron en matraces de agitación únicamente.

- 5 [0249] Las mutaciones del mutante de CBH2 FCA557 (P98L/M134V/S316P/S413Y) (de genotecas QC, Ejemplo 4) se combinaron (TABLA 9) con las de los mutantes de CBH2 FCA 564 (S316P/V323Y), FCA568 (V206L/S210R/T214Y/S316P) y FCA570 (M134L/L144R/S316P) (de genotecas de región, Ejemplo 5), para obtener moléculas de CBH2 con estabilidad térmica mejorada.

**Tabla 9**

	P98L	M1M134L	M134V	L144R	V206L	S210R	S210L	T214Y	S316P	V323Y	S413Y
FCA572	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
FCA573	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
FCA574	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
FCA575	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
FCA576	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
FCA577	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
FCA578	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
FCA579	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
FCA580	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+

- 10 [0250] Los cebadores se construyeron y se ordenaron de Invitrogen:

**Tabla 10**

Nombre del cebador	bps
S316P / V323Y-directo	CCAGCCCCCACC GTACACGCAAGGCAACGCTTACTACAAC GAGAAG
S316P / V323Y-inverso	CTTCTCGTTGTAGTAAGCGTTGCCTTGCGTGTACGGTGGGG GGCTGG
S210R-dir.	CGTCAAATTGTCGTGGAATATCGCGATATCCGGTACCTCCTG GTTATTG
S210R-inv.	CAATAACCAGGAGGTACCGGATATCGCGATATTCCACGACAA TTTGACG
S210L- dir.	CGTCAAATTGTCGTGGAATATCTCGATATCCGGTACCTCCTG GTTATTG
S210L- inv.	CAATAACCAGGAGGTACCGGATATCGAGATATTCCACGACAA TTTGACG
V206L/S210R/T214Y - dir.	CGTCAAATTCTCGTGGAATATCGCGATATCCGGTACCTCCTG GTTATTG
V206L/S210R/T214Y - inv.	CAATAACCAGGAGGTACCGGATATCGCGATATTCCACGAGAA TTTGACG
M134L/L144R- dir.	CCCTCTTTTCTGTGGCTAGATACTCTTGACAAGACCCCTCGC ATGGAGCAAACC
M134L/L144R- inv.	GGTTTGCTCCATGCGAGGGGTCTTGTCAAGAGTATCTAGCCA CAGAAAAGAGGG

[0251] La PCR se realizó utilizando los reactivos de reacción de la Tabla 11 (a continuación), para obtener todos los fragmentos (A - M) necesarios para construir las 9 genotecas combinatorias de CBH2. Se utilizó la ADN polimerasa Phusion (Finnzymes; Cat. n.º F-530). La concentración del cebador fue de 10 µM. Las condiciones de ciclo se proporcionan en la Tabla 2 (arriba).

- 15

**Tabla 11**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Plantilla FCA557 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dNTP (10 mM) (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tampón 5* HF (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
DMSO (µl)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Enzima Phusion (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

ES 2 554 467 T3

C E B A D O R E S	CBH2-attB1 Directo	2	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	CBH2-attB2 Inverso	-	2	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-
	M134L / L144R-dir.	-	-	-	2	2	-	-	-	2	2	2	-	-
	M134L / L144R-inv.	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S316P / V323Y- dir.	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
	S316P / V323Y- inv.	-	-	-	-	-	2	-	2	2	-	-	2	2
	V206L/S210R/T214Y- dir.	-	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
	Plantilla FCA557 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	dNTP (10 mM) (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Tampón 5* HF (µl)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	DMSO (µl)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
	Enzima Phusion (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	V206L/S210R/T214Y- inv.	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	210R directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	210R inverso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
	210L Directo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
	210L Inverso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
	Agua MilliQ estéril	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32

[0252] Los fragmentos de PCR se colocaron en un gel LMT al 1 %, y se purificaron con un kit de extracción en gel de Qiagen (Stratagene Cat. n.º 28706). Los fragmentos purificados se fusionaron utilizando ADN polimerasa Phusion (véase arriba) con los cebadores attB de CBH2 (arriba), para obtener las genotecas combinatorias de CBH2 completas de conformidad con la Tabla 12.

5

**Tabla 12**

Mutante nr.	PCR nr.	Mutaciones finales
FCA572	A	P98L+M134V+V206L+S210R+T214Y+S316P+S413Y
	B	
FCA573	C	P98L+M134L+ L144R+S316P+S413Y
	D	
FCA574	C	P98L+M134L+L144R+V206L+S210R+T214Y+S316P+S413Y
	E	
	B	
FCA575	F	P98L+M134V+S316P+V323Y+S413Y
	G	
FCA576	A	P98L+M134V+V206L+S210R+T214Y+S316P+V323Y+S413Y
	H	
	G	
FCA577	C	P98L+M134L+L144R+S316P+V323Y+S413Y
	I	
	G	
FCA578	C	P98L+M134L+L144R+V206L+S210R+T214Y+S316P+V323Y+S413Y
	E	
	H	
	G	
FCA579	C	P98L+M134L+L144R+S210L+T214Y+S316P+V323Y+S413Y
	K	
	L	
	G	
FCA580	C	P98L+M134L+L144R+S210R+T214Y+S316P+V323Y+S413Y
	J	
	M	
	G	

**[0253]** Las moléculas attB de CBH2 completas se purificaron a partir de agarosa LMT al 1 % y se transfirieron al vector de expresión pRAXdest#2 de *A. niger* AP4. El método utilizado fue el "Protocolo de un tubo para clonar productos attB-PCR directamente en vectores de destino" (de conformidad con el manual de Invitrogen).

5 **[0254]** Se utilizaron tres microlitros µl de la muestra de reacción para la transformación de 100 µl de células competentes de máxima eficiencia DH5α (Invitrogen, Cat. n.º 18258012) de conformidad con el manual. Después de 1 hora de crecimiento a 37 °C en el medio SOC, las células se colocaron en placas de ampicilina selectivas (100 µg/ml), y se incubaron a 37 °C durante la noche. Se cultivaron los clones positivos en el medio 2\*TY y 100 µg/ml de ampicilina. Se aisló ADN plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen Cat. n.º 27106) y se secuenció.

10 **[0255]** Los mutantes con la secuencia correcta se transfirieron al vector de expresión pRAXdest#2 de *A. niger* con la reacción LR, de conformidad con el procedimiento de clonación Gateway (Invitrogen; Cat. n.º 11791019). Después de la transformación de los protoplastos de los clones de expresión a *A. niger* AP4, los mutantes múltiples se expresaron y se aislaron (como en el Ejemplo 7) y se analizaron para termoestabilidad (Tablas 18, 9).

## 15 EJEMPLO 7

### Expresión y aislamiento de CBH2 y sus variantes a partir de crecimientos en matraces de agitación

**[0256]** Con el fin de proporcionar los materiales para las mediciones de Tf en los estudios de desnaturalización térmica (Ejemplo 9), se cultivaron clones de expresión en matraces de agitación y a continuación se purificaron las moléculas de CBH2, como sigue:

20 **[0257]** Las células se transformaron con un vector de expresión que comprendía un ácido nucleico que codificaba la variante de celulasa CBH2. Los constructos se transformaron en *A. niger var. awamori* de conformidad con el método descrito por Cao *et al* (Cao Q-N, Stubbs M, Ngo KQP, Ward M, Cunningham A, Pai EF, Tu G-C y Hofmann T (2000) Penicillopepsin-JT2 a recombinant enzyme from *Penicillium janthinellum* and contribution of a hydrogen bond in subsite S3 to kcat Protein Science 9:991-1001).

25 **[0258]** Los transformantes de *A. niger var. awamori* se cultivaron en un medio mínimo que carecía de uridina (Ballance *et al.* 1983). Los transformantes se cultivaron inoculando 1 cm<sup>2</sup> de suspensión de esporas a partir de la placa de agar con crecimiento esporulado en matraces de agitación de 100 ml durante 3 días a 37 °C como describe Cao *et al.* (2000), y después se cribaron para actividad de celulasa.

30 **[0259]** El ensayo de actividad de CBH2 se basó en la hidrólisis de la celulasa hinchada con ácido fosfórico (PASC: PASC al 0,5% en 0,5 mM de acetato de sodio, pH 4.85). Se midieron los azúcares reductores mediante ensayo PAHBAH. (PAHBAH: 2,975 g de PAHBAH, 9,75 g de Na-K-tartrato en 195 ml de NaOH al 2%). PASC: (Karlsson, J. *et al.* (2001), *Eur. J. Biochem*, 268, 6498-6507, Wood, T. (1988) en *Methods in Enzymology*, Vol. 160. *Biomass Part a Cellulose and Hemicellulose* (Wood, W. & Kellog, S. Eds.), pp. 19-25, Academic Press, San Diego, CA, USA) y PAHBAH: (Lever, M. (1972) *Analytical Biochemistry*, 47, 273, Blakeney, A.B. & Mutton, L.L. (1980) *Journal of Science of Food and Agriculture*, 31, 889, Henry, R.J. (1984) *Journal of the Institute of Brewing*, 90, 37)

**[0260]** La Cel6A natural y las variantes se purificaron entonces a partir de los sobrenadantes libres de células de estos cultivos mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés) mediante uno de dos procedimientos:

40 **[0261]** Para las variantes SDM (Ejemplo 3), se utilizaron Columnas Bio-RAD Poly-Prep CAT# 731-1550 con resina de fenil sefarosa de Pharmacia (1,6 ml = 1 ml de columna) CAT # 17-0973-05. Se dejó que la resina se depositara antes de lavarla con 1-2 volúmenes de columna (CV, por sus siglas en inglés) de agua, después se equilibró con 5 CV de 0,020 M de fosfato de sodio, 0,5 M de sulfato de amonio, pH 6.8 (Tampón A). Se añadieron 4 M de sulfato de amonio a los sobrenadantes a una concentración final de aproximadamente 0,5 M. Se cargaron 45 2 CV de sobrenadante y la columna se lavó a continuación con 5 CV de Tampón A, antes de la elución con 4 CV de 0,020 M de fosfato de sodio, pH 6.8. El filtrado contenía CBH2 purificada.

50 **[0262]** Para mutantes múltiples (Ejemplo 6), se pusieron las columnas en un colector de vacío Novagen utilizando resina 20 HP2 Poros® elaborada por Applied Biosystems. Se equilibraron las columnas de HIC con 5 CV de Tampón A. Se añadió sulfato de amonio a los sobrenadantes a una concentración final de aproximadamente 0,5 M y se ajustó el pH a 6.8. Después de la filtración, se cargó el sobrenadante, se lavó la columna con 10 CV de Tampón A y a continuación se eluyó con 10 CV de 0,020 M de fosfato de sodio, pH 6.80. Se recogieron las fracciones y se juntaron basándose en la presencia de CBH2, como se detectó mediante el análisis en gel SDS-PAGE reducido.

55 **[0263]** Cuando se desee, las moléculas de CBH2 se desglucosilan antes de la purificación mediante tratamiento del sobrenadante con endoglucosidasa H de conformidad con el protocolo proporcionado (Sigma-Aldrich).

**EJEMPLO 8**

**Termoestabilidad de las variantes de CBH2 mediante inactivación térmica**

5 **[0264]** Se identificaron las moléculas de CBH2 con estabilidad alterada a la inactivación térmica irreversible en comparación con la CBH2 natural mediante la medición de la actividad PASC de alícuotas iguales de sobrenadantes libres de células antes y después de la incubación a temperatura elevada bajo condiciones restrictivas. Las condiciones restrictivas utilizadas fueron 1 hora de incubación a 61 °C o 65 °C (como se indica) de una dilución 1:1 del sobrenadante en 0,1 M de acetato de sodio, pH 4.85, seguido del enfriamiento en hielo durante 10 minutos. Se calculó el % de actividad residual (% de actividad restante después de la incubación a condiciones elevadas) dividiendo la actividad residual por la actividad inicial (actividad de CBH2 en PASC antes de la incubación restrictiva).

**[0265]** El cribado de las variantes de CBH2 y la natural para la estabilidad a la inactivación térmica se realizó de conformidad con los siguientes protocolos:

**A. Soluciones y medios**

15 **[0266]** Las siguientes soluciones/medios se utilizaron en la determinación de la estabilidad de los mutantes de CBH2 a la inactivación térmica irreversible:

1. Se preparó un medio mínimo más maltosa (medio MM) como se muestra en la Tabla 13:

**Tabla 13: Medio mínimo + maltosa para *A. niger***

1	<b>Medio de maltosa MM</b> (medio mínimo líquido con maltosa)	- 6 g NaNO <sub>3</sub> - 0,52 g KCl - 1,52 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		Ajustar a aprox. 800 ml con agua MilliQ, autoclave y enfriar a 50 °C. Añadir por litro las siguientes soluciones estériles: - 1 ml Solución de oligoelementos-LW (véase 2) - 2,5 ml Solución madre de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O al 20 % - 50 ml Solución madre de maltosa al 50 % (conc. final: 2,5 %) - 20 ml Solución madre de 100 <sup>mg/ml</sup> de arginina (conc. final: 2 <sup>g/l</sup> ) - 20 ml Solución madre de metionina (50 g/l) / biotina (0,2 g/l) - 20 ml Tampón de 1 M de fosfato pH 5.8 (véase 3) Opcional: adición de 1 ml 50 <sup>mg/ml</sup> de estreptomina Para huésped de <i>A. niger</i> : añadir 10 ml 200 <sup>mg/ml</sup> de solución madre de uridina (conc. final: 2 <sup>g/l</sup> ). Ajustar a 1 litro con agua destilada y esterilizar por filtración (0,2 µm)
2	<b>Oligoelementos-LW</b> (L. Wilson)	- 1 g FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O - 8,8 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O - 0,4 g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O - 0,15 g MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O - 0,1 g Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O - 50 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O - 250 ml agua destilada, agitar y añadir - 0,20 ml HCl concentrado para disolver los cristales (4N) Ajustar a 1 litro con agua destilada y esterilizar por filtración (0,2 µm)
3	<b>Tampón fosfato pH 5.8</b>	1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Mezclar ambas soluciones hasta que el pH=5.8 y esterilizar por filtración (0,2 µm)

2. Solución PASC al 0,5 % en 50 mM de NaAc pH 4.85:

- 20 i. Añadir 5 gramos de Avicel PH101 (Fluka 11365) a un vaso de precipitado de un litro y añadir -12 ml de agua para elaborar una suspensión espesa.
- ii. Colocar el vaso de precipitado sobre hielo.
- 25 iii. Añadir 150 ml de ácido ortofosfórico al 85 % enfriado con hielo (Art. 1000573 Merck) y mezclar con el ultra turrax a alta velocidad (para evitar salpicaduras) durante aproximadamente 1 hora.
- iv. Añadir 100 ml de acetona enfriada con hielo, lo cual provoca una precipitación lenta de la celulosa amorfa a una suspensión muy espesa. Finalmente, utilizar una espátula para mezclar mejor.
- v. Diluir la suspensión muy espesa hasta ~1 litro con agua para hacerla lo suficientemente fluida para transferirla a 6 recipientes Sorvall de 250 ml.
- vi. Centrifugar 15 minutos a 10 k y descartar el sobrenadante.

vii. Mezclar las *pellets* con tanta agua como los vasos de precipitación puedan contener y centrifugar de nuevo.

viii. Repetir los pasos 5 y 6 al menos tres veces hasta que el pH se haya aumentado a pH 4.0 - 5.0.

ix. Para aumentar el lavado del ácido fosfórico se puede añadir una gota de NaOH 4N al agua.

5 x. Mezclar las últimas *pellets* con agua hasta ~300 ml y homogeneizar.

xi. Determinar la concentración de la suspensión con medición de peso seco. Esterilizar la suspensión durante 20 minutos a 121 °C. Enfriar y almacenar en el refrigerador.

3. Se prepararon reactivos de PAHBAH como sigue: 1,5 g de PAHBAH + 5 g de Sodio-Potasio-tartrato en 100 ml de NaOH al 2%.

10 4. Soluciones madre de celobiosa; en agua MQ preparar una solución de 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 y 1 mg/ml.

## B. Preparación de muestras

### [0267]

15 1. Cultivar variantes de *A. niger* en MTP (placas de microtitulación) de filtro de 96 pocillos (Millipore, # MAGVS2210), que contienen 200 µl de medio mínimo + maltosa (arriba) por pocillo durante 7 días a 33 °C, en un agitador orbital (225 rpm) con 80 % - 90 % de humedad.

2. Después de la incubación de crecimiento, filtrar los cultivos utilizando un colector de vacío, recoger el filtrado (sobrenadante) en una MTP plana de 96 pocillos limpia (Greiner, # 655101), almacenar a 4 °C.

## C. Incubación restrictiva a temperaturas elevadas

20 [0268]

1. Diluir 60 µl de sobrenadante (sob) por pocillo con 60 µl 100 mM de NaAc pH 4.85 (1:1).

(Opcional: Cuando el sobrenadante restante necesita comprobarse para azúcares residuales, añadir 190 µl 100mM de NaAc pH 4.8 a 10 µl de sob por pocillo y transferir 20 µl de este sobrenadante diluido a 150 µl de reactivos PAHBAH para realizar el ensayo de azúcar reductor PAHBAH (véase E)

25 2. Transferir 20 µl de sobrenadante diluido a una MTP plana de 96 pocillos limpia y almacenar a 4 °C (para la actividad inicial)

3. Incubar el sobrenadante diluido restante (aprox. 100 µl) durante 1 hr a 61 °C (o 65 °C) (para la actividad residual)

4. Enfriar sobre hielo durante 10'.

30 **D. Incubación PASC; ensayo de conversión a pequeña escala (SSC, por sus siglas en inglés)**

### [0269]

1. Preparar en MTP planas y limpias: 180 µl/pocillo de una solución PASC al 0,5 % bien agitada en 50 mM de NaAc, pH 4.85.

35 2a. En una placa diseñada para medir la actividad residual, transferir (mezclando de arriba abajo) por pocillo 20 µl de sobrenadante diluido tratado (sob) después de preincubación a las MTP-PASC.

2b. En una segunda placa diseñada para medir la actividad inicial, transferir (mezclando de arriba abajo) por pocillo 180 µl de solución PASC a los 20 µl de sobrenadante diluido no tratado almacenado.

3. Sellar las MTP de sob-PASC e incubar durante 2 hr a 50 °C, agitar a 900 rpm.

4. Enfriar sobre hielo durante 10'.

40 5. Transferir la mezcla de sob-PASC a una MTP de filtro limpia, filtrar en un colector de vacío y recoger el filtrado.

## E. Ensayo de azúcar reductor PAHBAH

### [0270]

1. Preparar una MTP plana de 96 pocillos limpia con 150 µl de reactivos PAHBAH por pocillo.

45 2. Transferir 20 µl del filtrado de sob-PASC al PAHBAH (mezclando de arriba abajo)

3. Poner una línea de calibración en la columna 1 en la primera MTP; 20 µl de las soluciones madre de celobiosa (véase A4, arriba)

4. Incubar durante 1 hr a 69 °C, 900 rpm, enfriar a temperatura ambiente y centrifugar a 2000 rpm durante 2'.

50 5. Medir el punto de equivalencia OD410 en un lector de MTP directamente en un espectrofotómetro SpectraMax (Spectra, Sunnyvale, CA, EEUU)

## F. Procesamiento de datos (Spad-it)

### [0271]

1. A partir de las lecturas sobre los pocillos de dilución de celobiosa, trazar una línea de calibración de celobiosa en mg/ml de celobiosa vs. OD410
  2. Utilizar la curva de calibración y las lecturas de los pocillos de muestra para calcular, en mg/ml de celobiosa, los valores iniciales y residuales para cada sob
  3. Calcular el % de actividad residual
- 5

*Mediciones de actividad residual para las variantes de CBH2 de mutagénesis de sitio dirigido*

[0272]

**Tabla 14: Actividad residual de Cel6A natural y variantes**

mutación	% res. 1 hr 61 °C	desv. estándar	% res. 1 hr 65 °C	desv. estándar
V94E	18,9	1,4	10,8	4,8
P98L	30,1	0,6	11,2	1,8
G118P	10,4	0,6	7,4	1,7
<b>natural</b>	21,1	4,1	8,6	0,4
M120L	19,8	0,3	9,9	2,2
M134V	27,5	2,1	9,7	1,3
T142V	22,5	1,0	6,1	1,4
T148Y	16,8	2,9	13,7	2,7
L179A	20,0	0,5	4,7	0,2
V206L	21,1	2,8	7,7	1,6
I212V	23,3	1,9	11,6	4,1
<b>natural</b>	20,0	1,5	5,6	1,2
L215I	26,6	1,3	5,2	1,0
G231 N	23,2	0,5	5,3	1,1
T232V	24,1	1,4	4,3	0,5
V250I	17,8	0,6	5,7	0,5
N285Q	15,7	3,9	6,6	2,5
S291G	18,3	0,2	4,6	0,0
T312S	15,7	0,2	6,8	0,3
<b>natural</b>	21,1	1,3	5,7	0,7
S316P	37,7	0,5	9,5	1,5
V323N	10,3	0,6	6,7	0,2
N325D	20,8	0,6	5,2	0,1
I333L	14,6	1,8	14,7	1,1
T349L	13,0	2,8	10,1	2,9
A381T	17,1	1,0	4,7	0,4
S386P	21,5	0,7	4,3	1,0
<b>natural</b>	20,2	1,1	5,3	1,1
F411Y	24,4	2,2	5,2	1,3
S413Y	39,1	1,0	8,2	0,6
A416G	7,0	0,7	5,8	0,4
A429T	15,8	1,8	6,3	0,5
M145L	9,3	2,2	9,5	3,4
Q204E	21,7	0,9	6,4	0,9
Q276L	10,1	1,4	4,8	0,6
<b>natural</b>	22,9	1,6	7,5	1,1
G308A	20,0	2,1	4,5	0,1
G334A	22,8	2,1	4,3	0,9
S343P	23,8	0,3	4,6	0,1
G360R	8,5	0,2	6,1	0,6
S380T	15,8	0,2	- 4,5	0,8
Q426E	28,7	1,5	3,7	0,5
T312S	18,9	2,7	9,2	3,7
<b>natural</b>	23,3	2,3	6,7	0,9
S316P	43,9	2,2	8,1	0,8
I333L	13,2	0,5	11,1	0,9

mutación	% res. 1 hr 61 °C	desv. estándar	% res. 1 hr 65 °C	desv. estándar
S413Y	43,0	1,4	6,1	1,4
A416G	9,6	0,7	6,1	0,3

El número de porcentaje de actividad residual de cada natural y variante es el promedio de 3 determinaciones. Desv. estándar = desviación estándar calculada para las determinaciones.

[0273] La tabla anterior muestra el % de actividad residual restante para los mutantes de sitio dirigido único (SDM, Ejemplo 3) después de 1 hora de incubación restrictiva a 61°C, o a 65 °C. Las actividades residuales de los clones de la natural se muestran en cada subconjunto de los datos (había una referencia de la natural en cada placa). El valor medio para la natural fue 21,4 % y 6,6 % a 61 °C y 65 °C, respectivamente. Resulta evidente que cada mutante con una actividad residual mayor que la de la natural es una molécula con termoestabilidad mejorada bajo las condiciones de cribado.

*Mediciones de actividad residual para los mutantes combinatorios de CBH2*

[0274] Las dos columnas de resultados de las Tablas 15 y 16 muestran los % de actividades residuales después de la incubación a dos temperaturas diferentes para las variantes producidas como en el Ejemplo 4.

[0275] A continuación, se presentan dos tablas (Tablas 15 Y 16), puesto que los valores se generaron en dos experimentos independientes.

[0276] Resulta evidente que cada mutante con una actividad residual mayor que la de la natural es una molécula con termoestabilidad mejorada bajo las condiciones de cribado.

**Tabla 15: Actividades residuales para Cel6A natural y variantes**

	% res. 1 hr 61 °C	desv. estándar	% res. 1 hr 65 °C	desv. estándar
P98L/M134V/T154A/V206L/I212V/S316P /F411Y/S413Y	51,8	2,5	10,6	2,2
P98L/T154A/I212V/F411Y	12,1	1,0	0,0	0,6
P98L/M134V/T212V/T312S/S316P/S413Y	51,0	3,8	9,6	0,9
P98L/M134V/T154A/I212V/T312S/S316P /S413Y	41,0	5,2	0,0	1,0
S316P/S413Y	46,5	4,6	6,8	0,7
P98L/M134V/T154A/V206L/S316P	43,0	2,3	0,0	2,3
P98L/M134V/S316P/S413Y	50,6	2,0	12,4	1,7
P98L/M134V/V206L/S316P/S413Y	54,4	3,3	13,3	2,4
P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/F411Y /S413Y	44,6	0,4	0,0	1,2
P98L/M134V/S316P	40,6	4,4	0,0	1,3
P98L/M134V/T154A/T312S	37,7	4,6	0,0	2,2
natural	14,9(8)	4,5	0(8)	1,5
P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/S413Y	51,2(8)	2,7	12,1 (8)	2,1

A menos que se indique lo contrario, el promedio de los % de actividades residuales se calculó a partir de 4 determinaciones. Donde se indica "(8)", se realizaron 8 determinaciones. Desv. estándar = desviación estándar calculada para las determinaciones.

**Tabla 16: Actividades residuales para Cel6A natural y variantes**

	% res. 1 hr 61 °C	desv. estándar	% res. 1 hr 65 °C	desv. estándar
P98L/M134V/I212V/S316P/S413Y	56,7(1)		13,2(1)	
natural	19,1(8)	2,6	0,3(8)	1
P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/S413Y	63,9 (8)	3,6	23,4 (8)	7,5

El promedio de los % de actividades residuales se calculó a partir del número de determinaciones indicado entre paréntesis, desv. estándar = desviación estándar calculada para las determinaciones.

*Mediciones de actividad residual para las variantes de CBH2 de mutagénesis regional*

[0277] La Tabla 17 muestra el % de actividad residual después de la incubación a 61°C para las variantes producidas como en el Ejemplo 5.

5

10

15

20

**Tabla 17: Actividades residuales para Cel6A natural y variantes**

	% res. 1 hr 61 °C	desv. estándar
S316PN323L	44,4	10,0
S316PN323Y	49,0	12,1
V206L/S210R/S316P	49,2	5,0
V206L/S316P	49,2	5,0
V206L/S210L/T214M/S316P	84,0	19,7
V206L/S210R/T214Y/S316P	69,3	15,9
M134G/L144G/S316P	93,5	6,1
M134L/L144R/S316P	70,6	4,2
M134L/L144S/S316P	62,0	15,0
natural	23,9 (32)	4,8
S316P	44,2 (32)	7,7

A menos que se indique lo contrario, cada número de % de actividad residual es el promedio de tres determinaciones. Donde se indica "(32)", se realizaron 32 determinaciones. Desv. estándar = desviación estándar calculada para las determinaciones.

[0278] Resulta obvio que cada mutante con una actividad residual mayor que la de la natural y/o que la de S316P es una molécula con termoestabilidad mejorada bajo las condiciones de cribado.

### Ejemplo 9

#### 5 Termoestabilidad de las variantes de CBH2 mediante mediciones de Tf

[0279] Se clonaron, se expresaron y se purificaron mutantes de celulasa CBH2 como se indica anteriormente (Ejemplo 7). Se recogieron los datos de desnaturalización térmica en un microcalorímetro VP-DSC de Microcal (Nothampton, Massachusetts, EEUU). Las condiciones del tampón fueron 50 mM Bis Tris. Propano/50 mM acetato de amonio/ácido acético glacial a pH 5.5 o a pH 5.0, como se indica. Las concentraciones de proteína fueron aproximadamente 0,25 mg/ml. Se realizaron tres escáneres térmicos desde 25 °C - 80 °C a un índice de escaneo de 90 (°C/hr). El primer escáner mostro desnaturalización térmica de la CBH2 y se utilizó para determinar el punto medio de desnaturalización térmica aparente, Tf: El software instrumental genera una curva Cp (cal/°C) versus Temperatura (°C) y la Tf se determinó manualmente a partir de esta curva. La desnaturalización térmica fue irreversible en todos los casos, como se muestra por la ausencia de desnaturalización térmica en el segundo y en el tercer escáner térmico.

**Tabla 18: Tf mediante DSC a pH 5.5.**

FCA	Variante	Tf G	Tf DG	ΔTf
500	Natural	66,6		
500	Natural	66,5		
502	P98L	67,1		0,6
502	P98L	66,9		0,4
505	M134V	66,9		0,3
505	M134V	66,7		0,2
522	T312S	64,1		-2,4
522	T312S	64,5		-2,1
522	T312S	64,1		-2,5
523	S316P	68,0		1,5
523	S316P	67,9		1,3
523	S316P	67,6		1,0
535	S413Y	66,8		0,2
535	S413Y	66,7		0,2
536	A416G	65,9		-0,6
536	A416G	65,6		-1,0
540	P98L/M134V/V206L/F411Y	67,2		0,6
541	P98L/M134V/V206L/I212V/S316P/F411Y	68,5		1,9

ES 2 554 467 T3

FCA	Variante	Tf G	Tf DG	ΔTf
542	I212V/S316P/F411Y	67,6		1,1
543	P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/S413Y	71,4		4,9
543	P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/S413Y	71,8		5,2
544	V206L/I212V/S316P	68,2		1,7
545	V206L/I212V/T312S/S316P	67,8		1,3
546	V206L/I212V/T312S/S316P/S413Y	69,8		3,2
547	V206L/I212V/T312S/S316P/F411Y/S413Y	69,0		2,5
548	M134V/V206L/I212V/T312S/S316P/F411Y/S413Y	69,2		2,7
549	P98L/V206L/I212V/T312S/S316P/F411Y/S413Y	69,5		3,0
550	P98L/M134V/V206L/I212V/T312S/S316P/S413Y	69,9		3,4
509	T154A		66,8	0,2
543	P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/S413Y		71,0	4,4
546	V206L/I212V/T312S/S316P/S413Y		69,6	3,0
551	P98L/M134V/V206L/I212V/S316P/F411Y/S413Y		71,2	4,6
552	P98L/T154A/I212V/F411Y		66,4	-0,2
555	S316P/S413Y		70,5	3,9
556	P98L/M134V/T154A/V206L/S316P		68,9	2,3
557	P98L/M134V/S316P/S413Y		71,3	4,7
558	P98L/M134V/V206L/S316P/S413Y		71,2	4,6
559	P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/F411Y/S413Y		69,8	3,2
560	P98UM134V/S316P		68,7	2,1
561	P98L/M134V/T154A/T312S		69,1	2,5
562	P98L/M134V/I212V/S316P/S413Y		71,2	4,6
563	S316PN323L		67,9	1,3
564	S316PN323Y		68,7	2,1
565	V206L/S210R/S316P		68,3	1,7
566	V206L/S316P		68,3	1,7
567	V206L/S210L/T214M/S316P		68,7	2,1
568	V206L/S210R/T214Y/S316P		69,1	2,5
569	M134G/L144G/S316P		66,1	-0,5
570	M134L/L144R/S316P		69,7	3,1
571	M134L/L144S/S316P		69,4	2,8
573	P98L/M134L/L144R/S316P/S413Y		71,8	5,2
575	P98L/M134V/S316P/V323Y/S413Y		70,8	4,2
577	P98L/M134L/L144R/S316P/V323Y/S413Y		71,8	5,2

Todos los datos de las variantes hacen referencia a la aún glicosilada FCA500 (rCBH2 natural) Tf. "Tf G" = Tf medida sobre proteína recombinante purificada. "Tf DG" = Tf medida sobre proteína recombinante desglucosilada con EndoH antes de ser purificada.

**Tabla 19: Tf mediante DSC a pH 5.0.**

FCA	Variante	Tf G	Tf DG	ΔTf
500	natural	67,2	66,9	
500	natural	67,1		
502	P98L	67,7		0,6
505	M134V	67,5		0,3
522	T312S	64,9		-2,2
523	S316P	68,4		1,3
523	S316P	68,4		1,3
535	S413Y	67,5		0,3
536	A416G	66,4		-0,7

Todos los datos de las variantes hacen referencia a la aún glicosilada FCA500 (rCBH2 natural) Tf. "Tf G" = Tf medida sobre proteína recombinante purificada. "Tf DG" = Tf medida sobre proteína recombinante desglucosilada con EndoH antes de ser purificada.

[0280] Las mutaciones introducidas en los mutantes de celulasa CBH2 afectaron a la estabilidad térmica del mutante de celulasa CBH2 en comparación con la natural.

[0281] Las proteínas desglicosiladas utilizadas en este ejemplo y en los siguientes ejemplos se prepararon utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica para la eliminación de glicanos ligados a N (véase, por ejemplo, *Biochem. J.* (2001) 358:423-430). Véase también Tai, T., *et al. J. Biol. Chem.* (1975) 250, 8569.

#### Ejemplo 10

##### Actividad específica de las variantes de CBH2 en PASC

[0282] Este ejemplo examina el rendimiento específico en celulosa hinchada con ácido fosfórico de las variantes de CBH2 en comparación con la CBH2 natural de *H. jecorina* que se ha clonado en *A. niger*.

10 [0283] Celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC) - Se preparó PASC de Avicel de conformidad con el método descrito en Walseth (1971) *Tappi* 35: 228 (1971) y Wood *Biochem J.* 121:353 (1971). Este material se diluyó con tampón y agua para conseguir una mezcla al 1 % p/v de tal manera que la concentración final del acetato de sodio fue 50 mM, pH 5.0.

15 [0284] El rendimiento específico relativo de estas variantes en sustratos celulósicos se determinó mediante técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Baker *et al, Appl Biochem Biotechnol* 1998 Spring; 70-72():395-403.

20 [0285] Se utilizó un ensayo de conversión celulósica estándar en los experimentos. Véase Baker, *supra*. En este ensayo, la enzima y el sustrato tamponado se colocaron en recipientes y se incubaron a una temperatura a través del tiempo. La reacción se enfrió con suficiente glicina 100 mM, pH 11.0, para llevar el pH de la mezcla de reacción al menos a pH 10. Una vez se enfrió la reacción, se filtró una alícuota de la mezcla de reacción a través de una membrana de 0,2 micras para eliminar los sólidos. La solución filtrada se analizó después para azúcares solubles mediante HPLC de conformidad con los métodos descritos en Baker *et al., Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72:395 - 403 (1998).

25 [0286] La actividad específica relativa de estas variantes se determinó con PASC al 1 % en 50 mM de NaOAc pH 5.0 a 53 °C con agitación a 1400 rpm durante 3,5 horas. Las enzimas se dosificaron a 0,75, 1,5 y 3 mg/gramo de celulosa. La concentración de proteína se determinó mediante densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) OD 280 como en Leach y Scheraga 1960 (*J. Am. Chem. Soc.* 82:4790-4792). Las variantes que se compararon fueron FCA500.3, FCA523, FCA536 y FCA540-550. Para una mayor simplicidad, la Figura 8 muestra únicamente FCA540, FCA542, FCA545, FCA547, FCA549 y FCA550. Todas las otras muestras de variantes tenían actividades específicas enlazadas mediante las líneas definidas por los resultados de FCA542 y FCA545.

30 [0287] Varias de las variantes de CBH2 nuevas provenientes del cribado de estabilidad de temperatura son tan activas como la natural.

35 [0288] Para comparar los números de los datos anteriores dependientes de la dosis (como se muestra en la Figura 8), se promedió el índice del azúcar total (medio) producido por una variante y el azúcar total (medio) producido por FCA500.3 (natural) a la misma dosis. Estos índices, presentados en la Figura 9, son todos muy similares, excepto FCA547, FCA549 y FCA550, que son mucho menos activas. Las barras de error son la desviación estándar única del promedio de los índices. Un índice de 1 indicaría que la variante tiene una actividad similar a la de la natural en este ensayo. Todas las variantes estabilizadas conservaron la actividad en este sustrato.

#### 40 Ejemplo 11

##### Actividad específica de las variantes de CBH2 en PCS

[0289] Este ejemplo compara la actividad específica en rastrojo de maíz pretratado de las variantes de CBH2 en comparación con la CBH2 de *H. jecorina* natural que se ha clonado en *A. niger*.

45 [0290] Rastrojo de maíz pretratado (PCS, por sus siglas en inglés) - Se pretrató rastrojo de maíz con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2 % p/p como se describe en Schell, D. *et al., J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 105:69 - 86 (2003) y seguido de los múltiples lavados con agua desionizada para obtener una pasta con un pH de 4.5. Después se añadió tampón de acetato de sodio (pH 5.0) (a una concentración final de 50 mM de acetato de sodio) y, en caso necesario, se tituló después la mezcla a pH 5.0 utilizando 1 N NaOH. La concentración de celulosa en la mezcla de reacción fue de aproximadamente 7 %. Se analizó el rendimiento específico de la CBH2 utilizando PCS a 53 °C con 700 rpm durante 20 horas. Se añadieron tres dosis diferentes de las variantes de CBH2, 0,75, 1,5 y 2,5 mg/g de celulosa (en el PCS), a 8,5 mg de caldo de la cepa de celulasa CBH2 delecionada/g de celulosa. (Para una exposición de la deleción del gen CBH2 en *Hypocrea jecorina* (también denominada *Trichoderma reesei*) véanse las patentes estadounidenses n.º 5.861.271 y 5.650.322). Los resultados se muestran en la Figura 10. Se muestra la actividad de referencia de la cepa de CBH2 delecionada (sin CBH2 añadida de nuevo). La variante de

CBH2 tiene actividad similar a la CBH2 natural en una celulosa entera reconstituida en PCS. Esto muestra que la natural, cuando se añade de nuevo a una cepa delecionada, proporciona una cierta actividad por encima de la cepa delecionada. La variante alcanza aproximadamente la misma actividad bajo condiciones similares.

5 [0291] Se llevaron a cabo ensayos similares para otras variantes como se describe anteriormente. Los valores de azúcares totales para los duplicados se promediaron en cada dosis y después se dividió este valor por el promedio de los duplicados correspondientes para FCA500.3 (natural). Estos índices, presentados en la Figura 11, son todos muy similares, excepto FCA547, FCA549 y FCA550, que son mucho menos activas. Las barras de error son la desviación estándar única de los índices a diferentes dosis. Un índice de 1 indicaría que la variante tiene una actividad similar a la de la natural en este ensayo. Todas las variantes estabilizadas conservaron la actividad en este sustrato.

### Ejemplo 12

#### Actividad específica de la variante de CBH2 a diversas temperaturas

[0292] Este ejemplo demuestra cuánto tiempo permaneció activa cada una de las enzimas (variantes estabilizadas y la natural) a diversas temperaturas.

15 [0293] Los ensayos descritos en el Ejemplo 10 se utilizaron en este Ejemplo con las modificaciones que aparecen a continuación. Se utilizó el azúcar total producido por CBH2 (0,5 mg/g de celulosa) en PASC al 1 % a 53 °C, 65 °C y 75 °C con agitación a 300 RPM durante diversos tiempos de incubación para determinar cuánto tiempo permaneció activa cada una de estas enzimas (variantes estabilizadas y la natural) a estas temperaturas.

20 [0294] A 53 °C, la variante poseía aproximadamente la misma actividad que la enzima natural durante el tiempo (véase la Figura 12). Debido a la estabilidad de las enzimas a 53 °C, no se pudieron determinar las vidas medias de las enzimas a partir de los datos. A 65 °C, el azúcar total producido por FCA543 y FCA500 muestra que FCA543 está activa durante un periodo de tiempo más largo que FCA500 (Figura 13). La vida media de la variante se determinó de aproximadamente 24 horas, mientras que la vida media de la natural fue de aproximadamente 4 horas. No obstante, ambas enzimas empiezan a fallar en el tiempo de incubación de 72 horas. A 75 °C, FCA543 produce más azúcar que FCA500 en la primera hora (véase la Figura 14).

### Ejemplo 13

#### Actividad específica de la variante de CBH2 con otras celulasas

[0295] Este ejemplo demuestra la utilización de la variante de CBH2 (es decir, estabilizada) en la conversión de biomasa en combinación con otras celulasas.

30 [0296] Una mezcla de tres enzimas con núcleo E1 de *Acidothermus cellulolyticus* (véase WO 05/093050) más la CBH1 y 2 natural (FCA301 y FCA500, respectivamente) o la CBH1 y 2 estabilizadas (FCA469 y FCA543, respectivamente) se analizó a 5 mg/g de celulosa y a 10 mg/g de celulosa y a 38 °C, 53 °C y 65 °C en el ensayo de conversión estándar utilizando PCS como sustrato (véase el Ejemplo 11). Las muestras se enfriaron en uno, dos y cinco días.

35 [0297] Se describen variantes de CBH1 en la publicación de patente estadounidense n.º 20050054039. La enzima E1 de *Acidothermus cellulolyticus* se describe en la patente estadounidense n.º 5.712.142. Se hace referencia a los siguientes documentos de patente WO 91/05039; WO 93/15186; la patente estadounidense n.º 5.275.944; WO 96/02551; la patente estadounidense n.º 5.536.655 y WO 00/70031. También se hace referencia a GenBank U33212.

40 [0298] Los resultados muestran que el rendimiento específico de la mezcla de variantes es aproximadamente igual que el de la mezcla de la natural a 38 °C. (Véase la Figura 15) Se observa un patrón similar para el rendimiento a 53 °C (no se muestran los datos).

[0299] La mezcla de variantes estabilizadas muestra un aumento significativo en el rendimiento específico con respecto a la mezcla de la natural a 65 °C. (Véase la Figura 16)

45 [0300] Utilizando el mismo ensayo de conversión estándar que se describe en el Ejemplo 11, se analizó el rendimiento específico de la mezcla de variantes estabilizadas a 56 °C, 59 °C y 62 °C a 5 y 10 mg/g de celulosa y se enfriaron las muestras a las 24, 48 y 120 horas. En las tres veces, 56 °C fue mejor que las temperaturas más altas. Véase la Figura 17. La temperatura óptima está por debajo de 59 °C en todas las veces analizadas.

## REIVINDICACIONES

1. Variante de celulasa CBH2 derivada de una proteína precursora por sustitución en una posición correspondiente al residuo S316 en la secuencia madura de CBH2 de *Hypocrea jecorina*,  
 5 en la que el residuo S316 en la secuencia madura de CBH2 de *Hypocrea jecorina* corresponde al residuo S340 en la Figura 1,  
 y en la que la variante tiene termoestabilidad aumentada en comparación con la proteína precursora.
2. Variante de celulasa CBH2 de conformidad con la reivindicación 1, en la que dicha variante comprende una sustitución en una posición correspondiente al residuo S316P en la secuencia madura de CBH2 de *Hypocrea jecorina*,  
 10 en la que el residuo S316 en la secuencia madura de CBH2 de *Hypocrea jecorina* corresponde al residuo S340 en la Figura 1.
3. Variante de celulasa CBH2 de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en la que dicha variante de CBH2 consiste esencialmente en las mutaciones seleccionadas del grupo consistente en:
- i. 1212V/S316P/F411Y;
  - 15 ii. M134G/L144G/S316P;
  - iii. M134L/L144R/S316P;
  - iv. M134L/L144S/S316P;
  - v. M134V/V206L/I212V/T312S/S316P/F411Y/S413Y;
  - 20 vi. P98L/M134L/L144R/S210L/T214Y/S316P/V323Y/S413Y
  - vii. P98L/M134L/L144R/S210R/T214Y/S316P/V323Y/S413Y
  - viii. P98L/M134L/UL144R/S316P/S413Y
  - ix. P98L/M134L/L144R/S316P/V323Y/S413Y
  - x. P98L/M134L/L144RN206L/S210R/T214Y/S316P/S413Y
  - 25 xi. P98L/M134L/L144RN206L/S210R/T214Y/S316PN323Y/S413Y
  - xii. P98L/M134V/I212V/S316P/S413Y
  - xiii. P98L/M134V/I212V/T312S/S316P/S413Y
  - xiv. P98L/M134V/S316P
  - xv. P98L/M134V/S316P/S413Y
  - xvi. P98L/M134V/S316P/V323Y/S413Y
  - 30 xvii. P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/F411Y/S413Y
  - xviii. P98L/M134V/T154A/I212V/S316P/S413Y
  - xix. P98L/M134V/T154A/I212V/T312S/S316P/S413Y
  - xx. P98L/M134V/T154A/V206L/I212V/S316P/F411Y/S413Y
  - xxi. P98L/M134V/T154A/V206L/S316P
  - 35 xxii. P98L/M134V/V206L/I212V/S316P/F411Y
  - xxiii. P98L/M134V/V206L/I212V/T312S/S316P/S413Y
  - xxiv. P98L/M134V/V206L/S210R/T214Y/S316P/S413Y
  - xxv. P98L/M134V/V206L/S210R/T214Y/S316P/N/323Y/S413Y
  - xxvi. P98L/M134V/V206L/S316P/S413Y
  - 40 xxvii. P98L/V206L/I212V/T312S/S316P/F411Y/S413Y
  - xxviii. S316P/S413Y
  - xxix. S316PN323L
  - xxx. S316PN323Y
  - xxxi. V206L/I212V/S316P
  - 45 xxxii. V206L/I212V/T312S/S316P
  - xxxiii. V206L/I212V/T312S/S316P/F41 Y/S413Y
  - xxxiv. V206L/I212V/T312S/S316P/S413Y
  - xxxv. V206L/I212V/T312S/S316P/S413Y
  - xxxvi. V206L/S210L/T214M/S316P
  - 50 xxxvii. V206L/S210R/S316P
  - xxxviii. V206L/S210R/T214Y/S316P; y
  - xxxix. V206L/S316P;
- en la secuencia madura de CBH2 de *Hypocrea jecorina* en la Figura 1.
- 55 4. Ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 de conformidad con la reivindicación 1.
5. Ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 de conformidad con la reivindicación 3.
6. Vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 de la reivindicación 4.
7. Vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de CBH2 de la reivindicación 5.

8. Célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 6.
9. Célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 7.
10. Método para producir una variante de CBH2 que comprende las etapas de:
- 5 (a) cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 8 en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones adecuadas para producir una variante de CBH2;  
(b) obtener dicha variante de CBH2 producida.
11. Método para producir una variante de CBH2 que comprende las etapas de:
- 10 (a) cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 9 en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones adecuadas para producir una variante de CBH2;  
(b) obtener dicha variante de CBH2 producida.
12. Composición detergente que comprende un surfactante y una variante de CBH2, en la que dicha variante de CBH2 comprende una variante de CBH2 de conformidad con la reivindicación 1.
13. Detergente de conformidad con la reivindicación 12, en el que dicho detergente es un detergente para ropa o un detergente para platos.
- 15 14. Aditivo para alimentación animal que comprende una variante de CBH2 de conformidad con la reivindicación 1.
- 15 15. Método para tratar pulpa de madera que comprende poner en contacto dicha pulpa de madera con una variante de CBH2 de conformidad con la reivindicación 1.
- 20 16. Método para convertir biomasa en azúcares que comprende poner en contacto dicha biomasa con una variante de CBH2 de conformidad con la reivindicación 1.

MIVGILTTLA TLATLAASVP LEERQACSSV WGQCGGQNWS GPTCCASGST  
CVYSNDYYSQ CLPGAASSSS STRAASTTSR VSPTTSRSSS ATPPPGSTTT  
RVPPVGSSTA TYSGNPFVGV TPWANAYYAS EVSSLAIPSL TGAMATAAAA  
VAKVPSFMWL DTLDKTPLME QTLADIRTAN KNNGNYAGQF VVYDLFDRDC  
AALASNGEYS IADGGVAKYK NYIDTIRQIV VEYSDIRTLI VIEPDSLNL  
VTNLGTPKCA NAQSAYLECI NYAVTQLNLP NVAMYLDAGH AGWLGWPAHQ  
DPAAQLFANV YKNASSPRAL RGLATNVANY NGWNITSPPS YTQGNVYNE  
KLYIHAIGPL LANHGWSNAF FITDQGRSGK OPTGQQQWGD WCNVIGTGFG  
IRPSANTGDS LLDSFVWVKP GGECDGTSDS SAPRFDSHCA LPDALQPAPQ  
AGAWFQAYFV QLLTNANPSF L

Figura 1: Secuencia de aminoácido de CBH2 de *Hypocrea jecorina* (P07987 en la Figura 3)

```

atgattgtcg gcattctcac cacgctggct acgctggcca cactcgcage tagtgtgctt
ctagaggagc ggcaagcttg ctcaagcgtc tggggccaat gtggtggcca gaattggctg 120
ggcccgactt gctgtgcttc cgggaagcaca tgcgtctact ccaacgacta ttactcccag 180
tgtcttcccg gcgctgcaag ctcaagctcg tccaacgctg ccgctcgcac gacttctcga 240
gtatccccc aacatcccg gtcgagctcc gcgacgctc cacctggctc tactactacc 300
agagtaacct cagtcggatc ggggaaccgt acgtattcag gcaacccttt tgttggggtc 360
actcctggg ccaatgcata ttacgcctct gaagttagca gcctcgcctat tcctagcttg 420
actggagcca tggccactgc tgcagcagct gtcgcaaagg ttccctcttt tatgtggcta 480
gatactcttg acaagacccc tctcatggag caaaccttgg ccgacatccg caccgccaac 540
aagaatggcg gtaactatgc cggacagttt gtggtgtatg acttgccgga tcgcgattgc 600
gctgcccttg cctcgaatgg cgaatactct attgccgatg gtggcgtcgc caaatataag 660
aactatctcg acaccattcg tcaaattgtc gtggaatatt ccgatatccg gaccctcctg 720
gttattgagc ctgactctct tgccaacctg gtgaccaacc tcggtactcc aaagtgtgcc 780
aatgctcagt cagcctacct tgagtgcac aactacgccc tcacacagct gaaccttcca 840
aatggtgcga tgtatttga cgtggccat gcaggatggc ttggctggcc ggcaaaccaa 900
gacccggccg ctgagctatt tgcaaatggt tacaagaatg catcgtctcc gagagctctt 960
cgcggttgg caaccaatgt cgccaactac aacgggtgga acattaccag cccccatcg 1020
tacacgcaag gcaacgctgt ctacaacgag aagctgtaca tccacgctat tggacctctt 1080
cttgccaatc acggctggtc caacgccttc ttcatcactg atcaaggctg atcgggaaag 1140
cagcctaccg gacagcaaca gtggggagac tgggtgcaatg tgatcggcac cggatttggg 1200
attcggccat ccgcaaacac tggggactcg ttgctggatt cgtttgtctg ggtcaagcca 1260
ggcggcgagt gtgacggcac cagcgacagc agtgcgccac gatttgactc ccactgtcgc 1320
ctcccagatg ccttgcaacc ggcgcctcaa gctgggtgctt ggttccaagc ctactttgtg 1380
cagcttctca caaacgcaaa cccatcgttc ctgtaa 1416

```

**Figura 2: secuencia de ADNc de CBH2 (M16190)**



Figura 3B

201 250  
 Q9C1S9 (196) QIVVYDLPRDCAAAAASNGEWAIANNGANNYKGYINRIREILLISFSDVRT  
 O93837 (175) IFVVYDLPRDCAAAAASNGEYTVANNGVANYKAYIDSIVAQLKAYPDVHT  
 P49075 (159) QIVVYDLPRDCAALASNGEFSLANDGLNKYKNYVDQIAAQIKQFPDVS  
 AF315681 (189) QFVVYDLPRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDTIRQIVVEYSDIRT  
 S76141 (181) QIVVIYDLPRDCAAKASNGEFSIANNGQANYENYIDQIVAQIQQFPDVRV  
 Q8N1B5 (179) IFVVYDLPRDCAAAAASNGEFSIANNGVALYKQYIDSIREQLTTYSDVHT  
 AF411251 (166) QIVVYDLPRDCAALASNGEFTIADNGEANYHDIYIDQIVAQIKQYPDVHV  
 P07987 (189) QFVVYDLPRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDTIRQIVVEYSDIRT  
 Consensus (201) QIVVYDLPRDCAALASNGEFSIANNGVANYKNYIDSTRAQI YSDVRT

251 300  
 Q9C1S9 (246) ILVIEPDSLANMVTNMMNVAKCSGAASTYRELTIIYALKQLDLPHVAMYMDA  
 O93837 (225) ILIIEPDSLANMVTNLSTAKCAEAQSAYYECVNYALINLNLANVAMYIDA  
 P49075 (209) VAVIEPDSLANLVTNLNVQKCANAQSAAYKEGVIIYAVQKLNNAVGMTMYIDA  
 AF315681 (239) LLVIEPDSLANLVTNLGTTPKCANAQSAYLECINYAVTQLNLPNVAMYMDA  
 S76141 (231) VAVIEPDSLANLVTNLNVQKCANAKTTYLACVNYALTNLAKVGVYMYMDA  
 Q8N1B5 (229) ILVIEPDSLANVVTNLNVPKCANAQDAYLECINYAITQLDLPNVAMYMDA  
 AF411251 (216) VAVIEPDSLANLVTNLVAKCANAQTTYLECVTYAMQQLSAVGMTMYMDA  
 P07987 (239) LLVIEPDSLANLVTNLGTTPKCANAQSAYLECINYAVTQLNLPNVAMYMDA  
 Consensus (251) ILVIEPDSLANLVTNLNV KCANAQSAYLECVNYALTQLNLPNVAMYMDA

301 350  
 Q9C1S9 (296) GHAGWLGWPANIQPAAELEFAKIYEDAGKPRAVRGLATNVANYNAWSISSP  
 O93837 (275) GHAGWLGWSANLSPAAQLFATVYKNASAPASLRGLATNVANYNAWSISSP  
 P49075 (259) GHAGWLGWPANLSPAAQLFAQIYRDAGSPRNLRGIATNVANFNALRASSP  
 AF315681 (289) GHAGWLGWPANQDPAQLFANVYKNASSPRALRGLATNVANYNGWNITSP  
 S76141 (281) GHAGWLGWPANLSPAAQLFTQVWQNAKSPFIKGLATNVANYNALQAASP  
 Q8N1B5 (279) GHAGWLGWQANLAPAAQLFASVYKNASSPASVRGLATNVANYNAWSISRC  
 AF411251 (266) GHAGWLGWPANLSPAAQLFTSLYSNAGSPSGVRGLATNVANYNALVATTP  
 P07987 (289) GHAGWLGWPANQDPAQLFANVYKNASSPRALRGLATNVANYNGWNITSP  
 Consensus (301) GHAGWLGWPANLSPAAQLFANVYKNASSPRALRGLATNVANYNAW ISSP

351 400  
 Q9C1S9 (346) PPYTSPNPNYDEKHYIEAFRPLLEARGFP-AQFIVDQGRSGKQPTGQKEW  
 O93837 (325) PSYTSGDSNYDEKLYINALSPLLTSNGWPNNAHFIMDTSRNGVQPTKQQAW  
 P49075 (309) DPITQGNPNYDEIHYIEALAPMLSN-AGFPAHFIVDQGRSGVQNR-DQW  
 AF315681 (339) PSYTQGNVYNEKLYIHAIGRLLANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQW  
 S76141 (331) DPITQGNPNYDEIHYINALAPLLQ-AGWDATFIVDQGRSGVQNR-QQW  
 Q8N1B5 (329) PSYTQGDANDEEDYVNALGPLFQEQGFP-AYFIIDTSRNGVRPTKQSQW  
 AF411251 (316) DPITQGDPNYDEMPLYIEALAPLLG---SFPAHFIVDQGRSGVQDIR-QQW  
 P07987 (339) PSYTQGNVYNEKLYIHAIGPELLANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQW  
 Consensus (351) PSYTQGNANYDEKLYI ALAPLL N GW AHFIVDQGRSGVQPTRQQQW

Figura 3C

```

                                401                                450
Q9C1S9 (395) GHWCNAIGTGFGMRPTANTGHQYVDAFVWVKPGGECDDGTSDDTTAARYDYH
O93837 (375) GDWCNVIGTGFGVQPTTNTGDPLEDAFVWVKPGGESDGTSNSSATRYDFH
P49075 (357) GDWCNVKAGFGQRPTTNTGSSSLIDAIWVWVKPGGECDDGTSDDNSSPRFDSH
AF315681 (389) GDWCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSEFVWVKPGGECDDGTSDDSSAPRFDSH
S76141 (379) GDWCNIKAGFGTRPTTNTGSQFIDSIVWVKPGGECDDGTSNSSSPRYDST
Q8N1B5 (378) GDWCNVIGTGFGVRPTTDTGNPLEDAFVWVKPGGESDGTSMNTTSPRYDYH
AF411251 (362) GDWCNVLGAGFGTQPTTNTGSSSLIDSIVWVKPGGECDDGTSNTSSPRYDAH
P07987 (389) GDWCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSEFVWVKPGGECDDGTSDDSSAPRFDSH
Consensus (401) GDWCNVIGTGFGIRPTTNTG SLIDAFVWVKPGGECDDGTSNSSAPRYDSH

                                451                                484
Q9C1S9 (445) CGLEDALKPAPEAGQWFQAYFEQLLRNANPPF--
O93837 (425) CGYSDALQPAPEAGTWFQAYFVQLLTNANPALV-
P49075 (407) CSLSDAHQPAPEAGTWFQAYFETLVANANPAL--
AF315681 (439) CALPDALQPAPQAGAWFQAYFVQLLTNANPSFL-
S76141 (429) CSLPDAAQPAPEAGTWFQAYFQTI.VSAANPPL--
Q8N1B5 (428) CGLSDALQPAPEAGTWFQAYFEQLLTNANPLF--
AF411251 (412) CGLPDATPNAPEAGTWFQAYFETLVEKANPPL--
P07987 (439) CALPDALQPAPQAGAWFQAYFVQLLTNANPSFL-
Consensus (451) CGLPDALQPAPEAGTWFQAYFEQLLTNANPAL

```

Figura 3: Alineamiento de CBH2 de *H. jecorina* con moléculas derivadas de *Humicola insolens* (Q9C1S9), *Acremonium cellulolyticus* (O93837), *Agaricus bisporus* (P49075), *Hypocrea koningii* (AF315681), *Phanerochaete chrysosporium* (S76141), *Talaromyces emersonii* (Q8N1B5), *Lentinula edodes* (AF411251), *Hypocrea jecorina* (P07987).

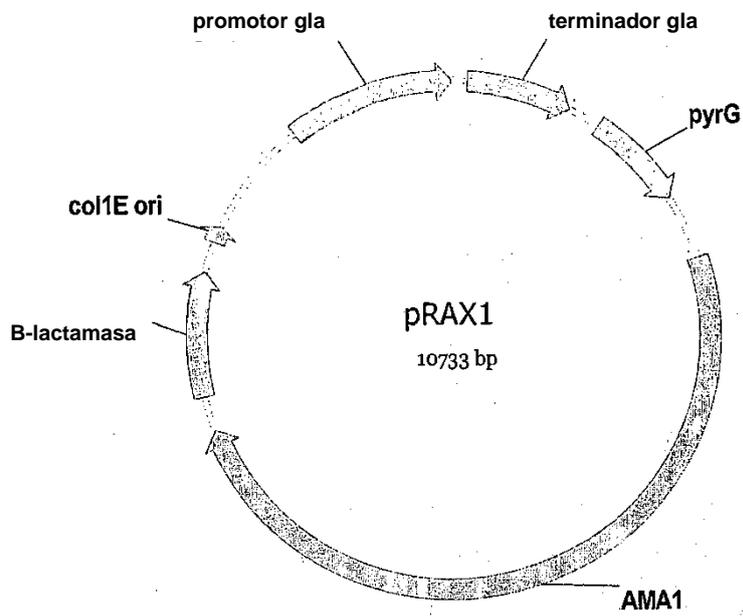
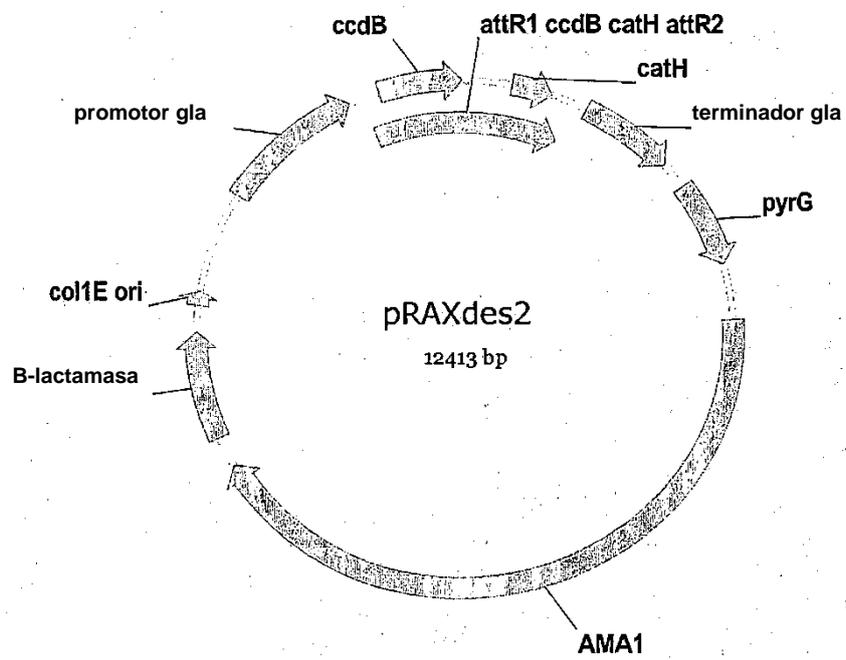


Figura 4: pRAX1

Figura 5: Vector de destino pRAXdes2 para expresión en *A. niger*



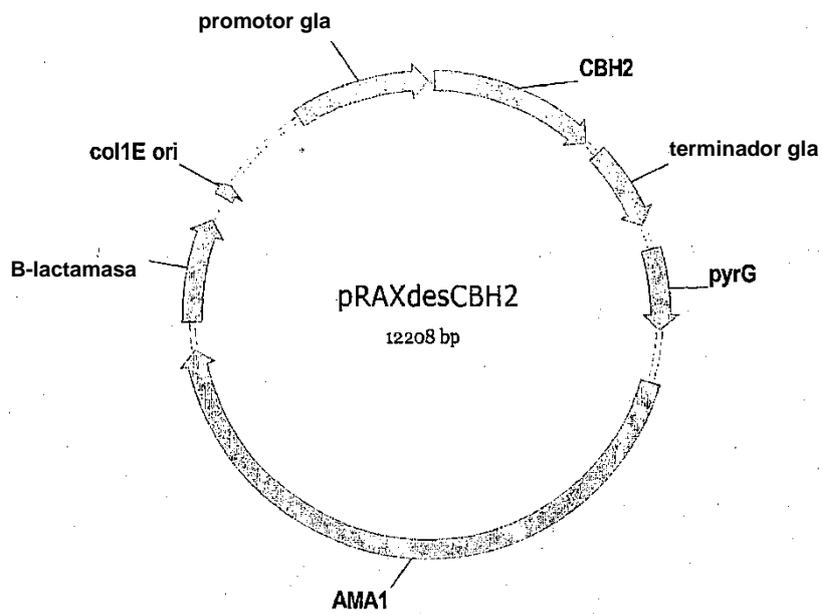


Figura 6: Vector pRAXdesCBH2 de expresión replicativa de genes CBH2 bajo el control del promotor de glucoamilasa. (El gen CBH2 designado en esta figura como CBH2 es el constructo de gen attB1-CBH2-attB2)

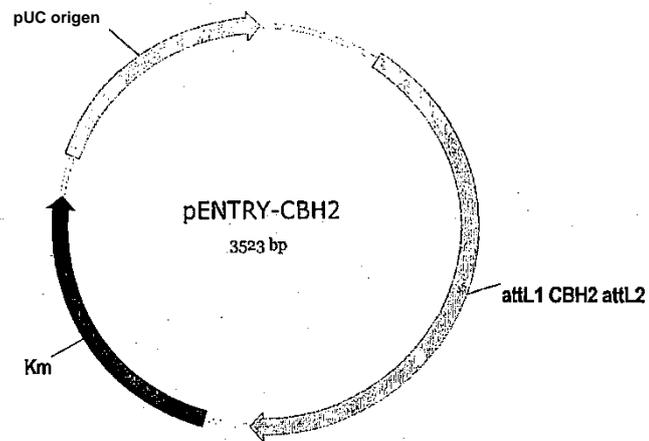


Figura 7: pENTRY-CBH2 utilizado para preparar el vector de expresión pRAXdesCBH2 mediante tecnología Gateway y como plantilla para mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quikchange.

Figura 8

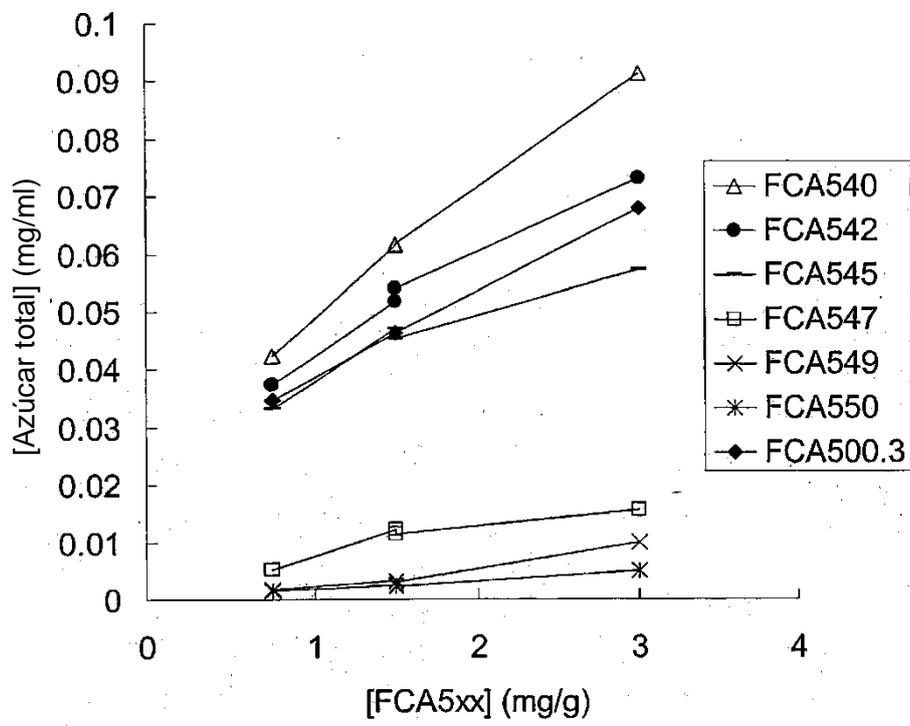


Figura 9

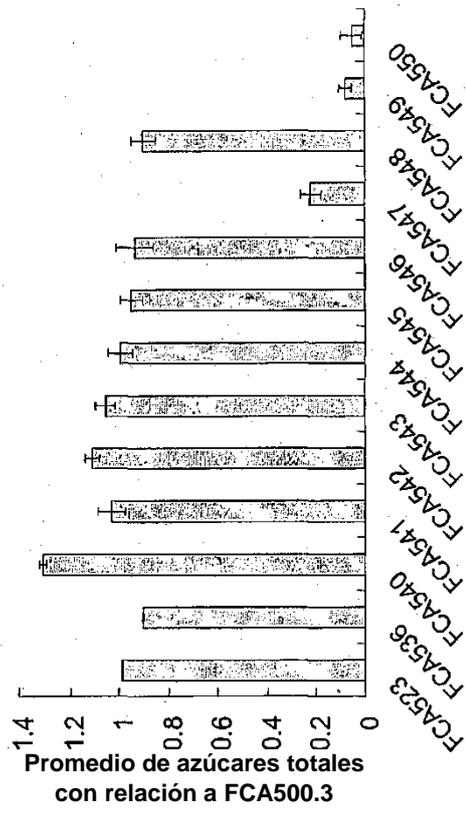


Figura 10

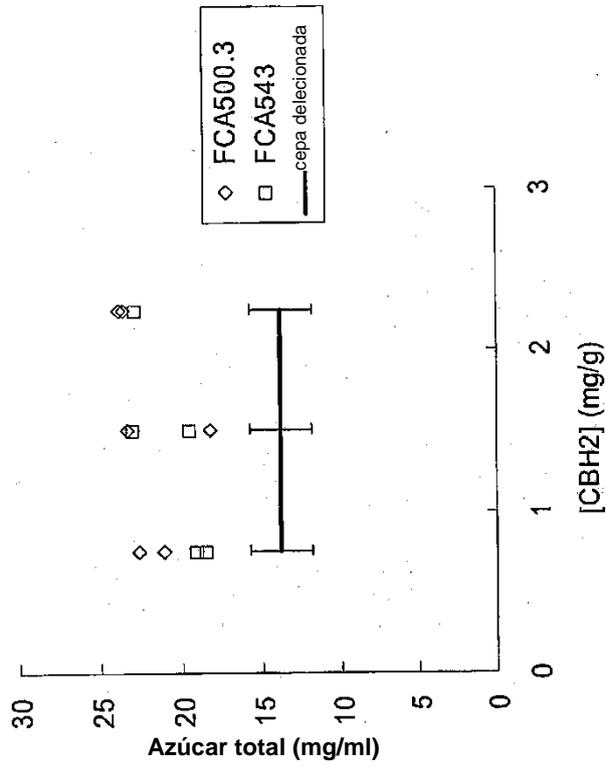


Figura 11

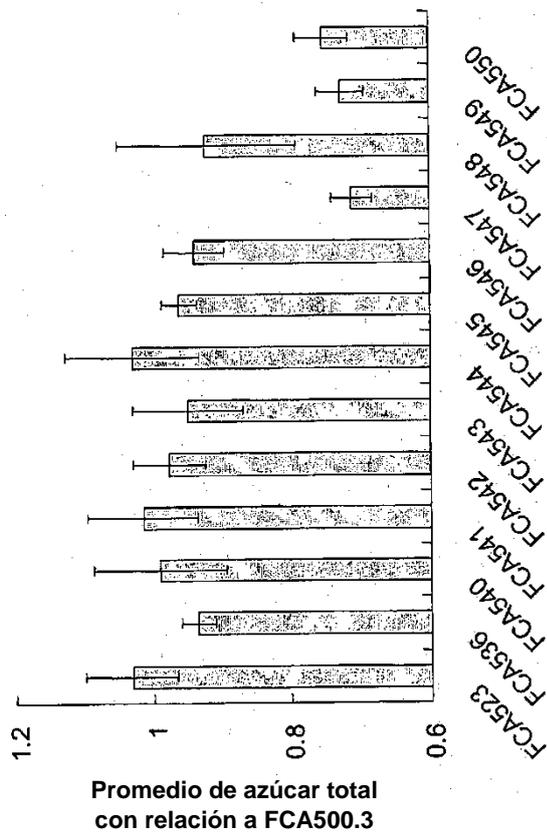


Figura 12

1% PASC, 53 °C, 300 RPM

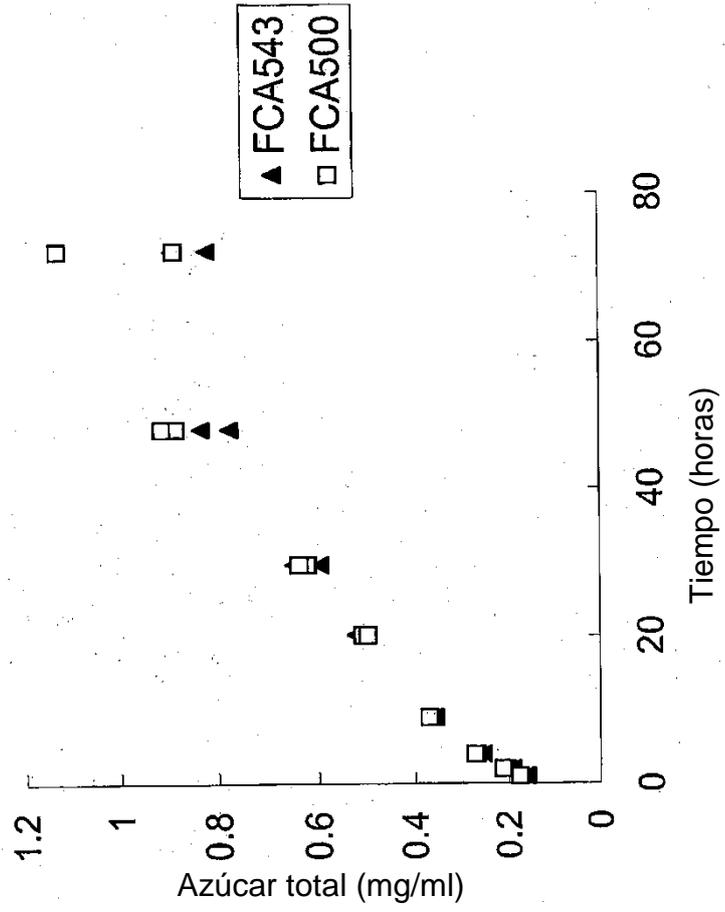


Figura 13

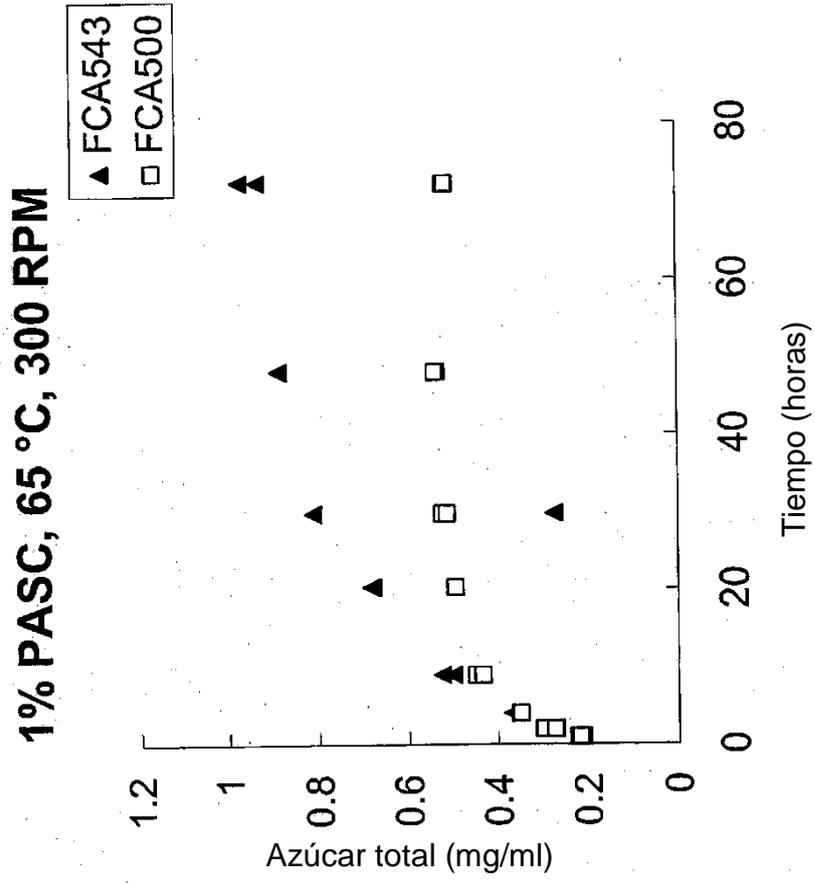


Figura 14

1% PASC, 75 °C, 300 RPM

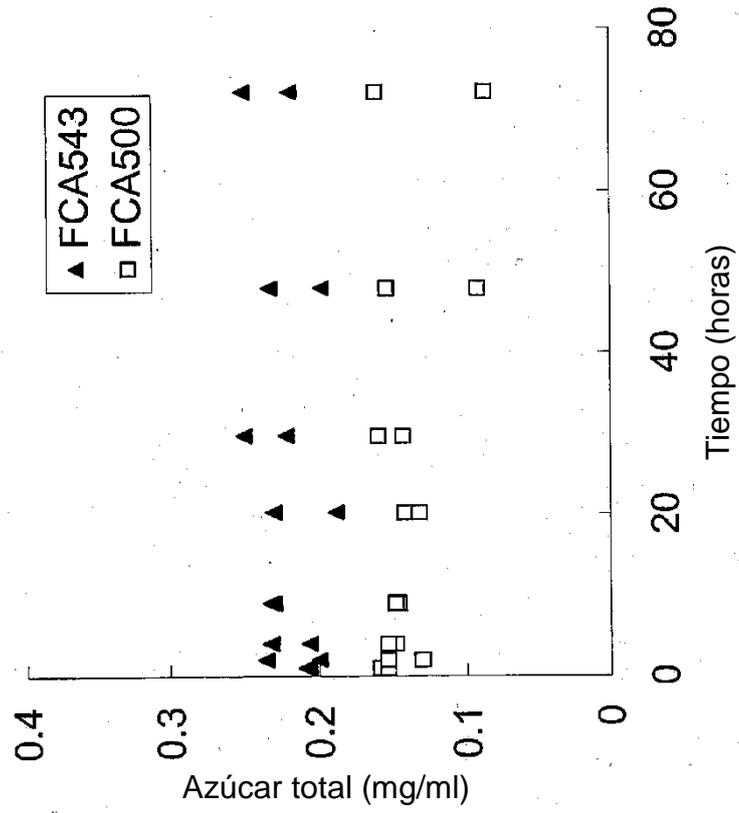


Figura 15

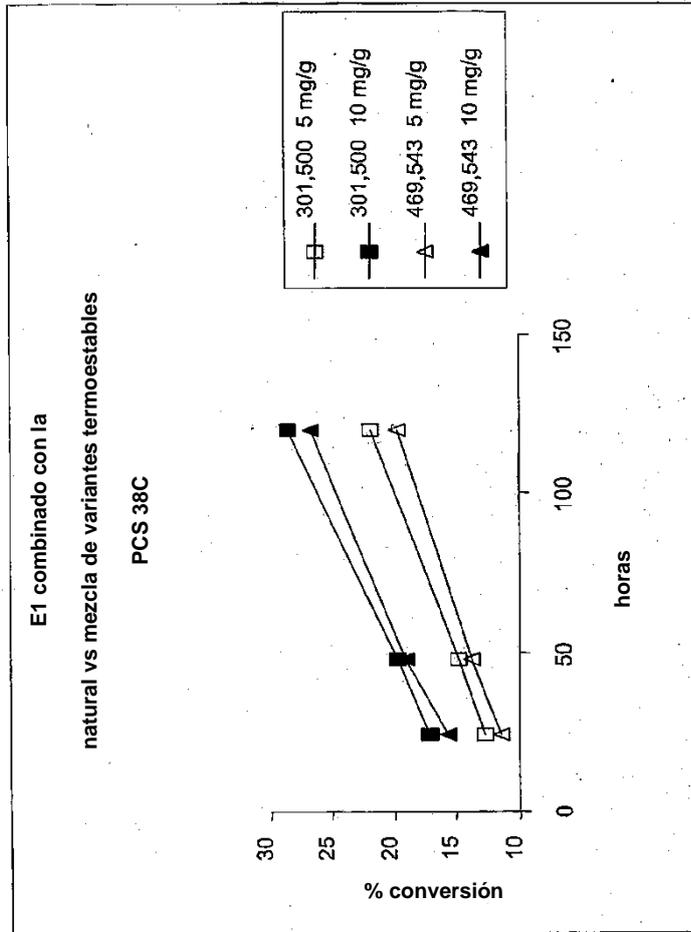


Figura 16

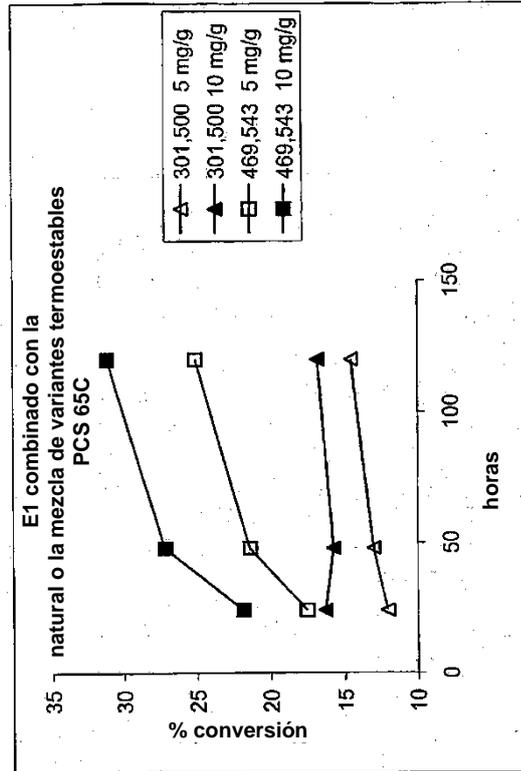


Figura 17

