



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

División de Nuevas Creaciones

E. S. D.

Asunto	NÚMERO DE RADICACIÓN	14-49610
Trámite	PATENTE DE INVENCION	
Evento	SOLICITUD	
Actuación	CONTESTACIÓN REQUERIMIENTO DE FORMA	
Título	BIOCATALIZADORES DE CÉLULAS ENTERAS EN LA DEGRADACIÓN DE LA BIOMASA CELULÓSICA	
Solicitante:	ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG.	

MAURICIO PINZÓN PINZÓN, actuando en calidad de apoderado de la sociedad **ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG.**, procedo a contestar en tiempo debido, el requerimiento de forma emitido por este despacho mediante Oficio 6574 de Mayo 29 de 2014 frente al cual presentamos solicitud de prórroga para su contestación el día 16 de Julio de 2014.

Con base en lo anterior, anexamos la siguiente documentación:

1. Poder debidamente otorgado a mi favor.
2. Documento mediante el cual se acredita la existencia y representación legal del solicitante con su respectiva traducción a idioma español.
3. Tres (3) contratos de cesión en los cuales consta la firma de los 4 inventores.
4. Tres (3) copias de certificado de los materiales biológicos utilizados con sus respectivas traducciones a idioma español.
5. Traducción a idioma español del texto de la patente con su correspondiente capítulo reivindicatorio.

De esta forma, habiendo cumplido con los requisitos exigidos por la normatividad andina, solicitamos muy respetuosamente continuar con el trámite aquí solicitado.

Cordialmente,


Mauricio Pinzon Pinzon
C.C. 79.145.527 de Usaquén
T.P. 37.230 del C.S.J
JOB/50823

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-049610- -00004-0000

Fecha: 2014-09-24 16:17:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 118



POWER OF ATTORNEY

Be it known that:

Mr/Mrs (Kestka) / (Buntenbreich)

Legally representing and acting on behalf of

ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co.Patente I KG i.L.,

a corporation addressed in:

12529 Schönefeld / Waltersdorf,
Germany

does hereby grant **POWER OF ATTORNEY** to:

**MAURICIO PINZON PINZON
SILVIA GARCIA CHACON
JULIANA ORDUZ BELTRÁN**

Lawyers in practice, of legal age, residing in Bogota D.C., Republic of Colombia, so that they may act in his own name and representation in order to carry out all the necessary steps and processes before the judicial, administrative and other authorities of the Republic of Colombia in order to:

1) Obtain the registration and or protection of the Intellectual Property Rights of the patent invention titled:

WHOLE-CELL BIOCATALYSTS IN THE DEGRADATION OF CELLULOSIC BIOMASS.

In carrying out the present mandate the proxy will be able to receive, withdraw,

PODER

Compareció:

Mr/Mrs _____

Representante legal de

ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co.Patente I KG i.L.,

Sociedad domiciliada en:

12529 Schönefeld / Waltersdorf,
Germany

otorgo **PODER** a:

**MAURICIO PINZON PINZON
SILVIA GARCIA CHACON
JULIANA ORDUZ BELTRÁN**

Abogados en ejercicio, mayores de edad, vecinos de Bogotá D.C., República de Colombia, para que en su nombre y representación adelanten ante las autoridades judiciales, administrativas o de policía de la República de Colombia y ante terceras personas, todas las acciones o gestiones según sea el caso encaminadas a:

1)Obtener el registro y/o protección de los Derechos de propiedad Intelectual de la patente de invención titulada:

BIOCATALIZADORES DE CÉLULAS ENTERAS EN LA DEGRADACIÓN DE LA BIOMASA CELULÓSICA.

En desarrollo del presente mandato los

compromise, conciliate, substitute, resume, and in general, carry out all kinds of actions which would lead to the obtention of the pursued matter.

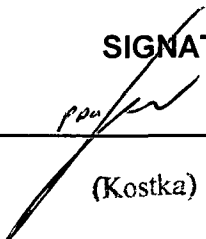
The proxy also is expressly authorized to to carry out for our bill the payments to third of rates, payments of services given for third parties in Colombia as in the exterior, bank commissions, freightages, notarial expenses and in general all the rest expenses that are needed for the effects of the complete fulfillment of this mandate.

3

apoderados podrán recibir, desistir, transigir, conciliar, sustituir, reasumir y en general realizar todo tipo de actos que contribuyan a la obtención del objeto perseguido

Nuestros apoderados igualmente quedan expresamente facultados para efectuar por cuenta nuestra el pago a terceros de tasas, pagos de servicios prestados por terceros en Colombia como en el exterior, comisiones bancarias, portes, gastos notariales y en general todos los demás gastos que se requieran para los efectos del cabal cumplimiento de este mandato.

SIGNATURE - FIRMADO


(Kostka)

(Signature)


(Bunttenbroich)

TO WHOM IT MAY CONCERN

- ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L. was established on 5 July 2006 and registered in the commercial register of Potsdam on 8 September 2006.
- The purpose of acquisition of industrial property rights, in particular patents, and the sale of exclusive licenses for such industrial property rights for the administration, development and exploitation thereof, the latter in particular by means of licenses. The investment company is entitled to effect all legal transactions and legal acts suitable for and related to promoting the purpose of the company itself, or to commission third parties to effect such transactions.
- Planned duration of the participation: about 6 years (until 31 December 2012).
- The period of validity of the investment company ended on 31 December 2012. It has therefore been in liquidation since 1 January 2013. The liquidation was registered in the commercial register on 22 February 2013.
- Die ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L. wurde am 5. Juli 2006 gegründet und am 8. September 2006 ins Handelsregister Potsdam eingetragen.
- Gesellschaftszweck der Fondsgesellschaft ist der Ankauf von gewerblichen Schutzrechten, insbesondere Patenten, oder der Abschluss von Exklusivlizenzen an diesen, um diese zu verwalten, zu entwickeln und vor allem durch Lizenzierung zu verwerten. Die Fondsgesellschaft ist berechtigt, selbst oder durch Beauftragung Dritter alle Rechtsgeschäfte und Rechtshandlungen vorzunehmen, die geeignet sind, den Gesellschaftszweck zu fördern und mit ihm im Zusammenhang stehen.
- Geplante Dauer der Beteiligung: Rund sechs Jahre, bis zum 31. Dezember 2012.
- Die Laufzeit der Fondsgesellschaft endete zum 31. Dezember 2012. Die Fondsgesellschaft befindet sich somit seit 1. Januar 2013 in der Liquidationsphase. Die Eintragung der Liquidation im Handelsregister erfolgte am 22. Februar 2013.

Düsseldorf, den/this 12.08.2014

ppa. 
Michael Krostka

ppa. 
Andre Buntbroich

Ich, Dr. Rainer Oppermann, Notar mit dem Amtssitz zu Düsseldorf, beglaubige die Unterschrift

I, the undersigned Dr. Rainer Oppermann, German Notary, duly admitted and sworn with official residence at Düsseldorf, herewith authenticate the signature

- vor mir vollzogen von
Herrn Michael Kostka,
geboren am 06.10.1961,
Königsallee 106, 40212 Düsseldorf,
ausgewiesen durch Bundespersonal-
ausweis,
- vor mir vollzogen von
Herrn Andre Bunttenbroich
geboren am 02.10.1971,
Königsallee 106, 40212 Düsseldorf,
ausgewiesen durch Bundespersonal-
ausweis.

- given before me by
Mr. Michael Kostka,
born October 6, 1961,
Königsallee 106, 40215 Düsseldorf,
identified by German Identity Card,
- given acknowledged before me by
Mr. Andre Bundenbroich,
born on October 2, 1971,
Königsallee 106, 40215 Düsseldorf,
identified by German Identity Card

Ich bescheinige:

I certify and confirm:

- Die **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH** mit Sitz in Schönefeld (die "GmbH") ist eine Gesellschaft mit beschränkter Haftung nach dem Recht der Bundesrepublik Deutschland und als solche im Handelsregister des Amtsgerichts Cottbus unter HRB 10073 CB eingetragen.
- Die **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L.** mit Sitz in Schönefeld (die "KG") ist eine Kommanditgesellschaft nach dem Recht der Bundesrepublik Deutschland und als solche im Handelsregister des Amtsgerichts Schönefeld unter HRA 2502 CB eingetragen.
- Die **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH** mit Sitz in Schönefeld (die "GmbH") ist als persönlich haftende Gesellschafterin und Liquidator berechtigt, die **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L.** mit Sitz in Schönefeld (die "KG") einzeln zu vertreten. Sie ist dabei von den Beschränkungen des § 181 BGB befreit.

- **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH** with registered office at Schönefeld (the "GmbH") is a "Gesellschaft mit beschränkter Haftung" (limited liability company) duly incorporated and existing under the laws of the Federal Republic of Germany being entered with the Commercial Register at Cottbus under HRB 10073 CB.
- **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L.** with registered office at Schönefeld (the "KG") is a "Kommanditgesellschaft" (limited partnership) duly incorporated and existing under the laws of the Federal Republic of Germany being entered with the Commercial Register at Cottbus under HRA 2502 CB.
- The **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH** as "persönlich haftender Gesellschafter" (general partner) and Liquidator is duly authorized to represent and act legally for and on behalf of the **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L.** with single authority - exempt from the prohibition of self-dealing pursuant to sec 181 German Civil Code -.

- Die Herren Michael Kostka und Andre Buntenbroich als Prokuristen, beide mit dem Recht zur Veräußerung und Belastung von Grundbesitz und jeder befreit von § 181 BGB, sind berechtigt, die "GmbH" und damit auch die "KG" gemeinsam zu vertreten.

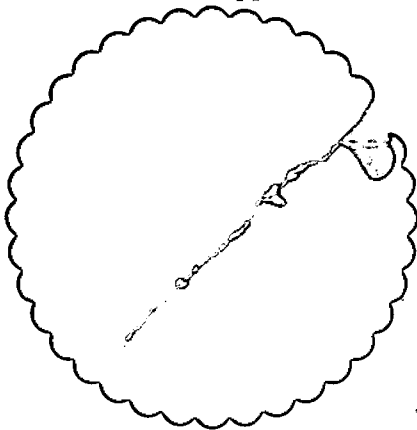
- Mr. Michael Kostka as "Prokurist" (officer with registered procuration) with the power to sell and encumber land - exempt from the prohibition of self-dealing pursuant to sec 181 German Civil Code - and Mr. Andre Buntenbroich as "Prokurist" (officer with registered procuration) with the power to sell and encumber land - exempt from the prohibition of self-dealing pursuant to sec. 181 German Civil Code - are duly authorized with joint authority to represent and act legally for and on behalf of the "GmbH" and thereby also for and on behalf of the "KG".

In testimony whereof I have hereunto set my hand and affixed my seal of office.

Düsseldorf, den/this 12. August 2014
Me/BE

Opp

Dr. Oppermann, Notar/Notary



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Notar Dr. Oppermann

3. in seiner Eigenschaft als Notar in Düsseldorf

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des Notars

Bestätigt

5. in Düsseldorf

6. am 13. AUG. 2014

7. durch den Präsidenten des Landgerichts

8. unter Nr. 9101 Ea - 3888 12014

9. Stempel:

10. Unterschrift:

In Vertretung

Seifert

(Seifert)
Vorsitzender Richter
am Landgericht

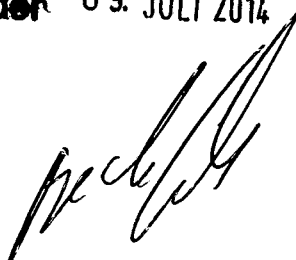


TO WHOM IT MAY CONCERN

- Die ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG wurde am 5. Juli 2006 gegründet und am 8. September 2006 ins Handelsregister eingetragen.
- Gesellschaftszweck der Fondsgesellschaft ist der Ankauf von gewerblichen Schutzrechten, insbesondere Patenten, oder der Abschluss von Exklusivlizenzen an diesen, um diese zu verwalten, zu entwickeln und vor allem durch Lizenzierung zu verwerten. Die Fondsgesellschaft ist berechtigt, selbst oder durch Beauftragung Dritter alle Rechtsgeschäfte und Rechtshandlungen vorzunehmen, die geeignet sind, den Gesellschaftszweck zu fördern und mit ihm im Zusammenhang stehen.
- Geplante Dauer der Beteiligung: Rund sechs Jahre, bis zum 31. Dezember 2012.
- Die Laufzeit der Fondsgesellschaft endete zum 31. Dezember 2012. Die Fondsgesellschaft befindet sich somit seit 1. Januar 2013 in der Liquidationsphase. Die Eintragung der Liquidation im Handelsregister erfolgte am 22. Februar 2013.

- ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG was established on 5 July 2006 and registered in the commercial register on 8 September 2006.
- The purpose of the investment company is the acquisition of industrial property rights, in particular patents, and the sale of exclusive licenses for such industrial property rights for the administration, development and exploitation thereof, the latter in particular by means of licenses. The investment company is entitled to effect all legal transactions and legal acts suitable for and related to promoting the purpose of the company itself, or to commission third parties to effect such transactions.
- Planned duration of the participation: about 6 years (until 31 December 2012).
- The period of validity of the investment company ended on 31 December 2012. It has therefore been in liquidation since 1 January 2013. The liquidation was registered in the commercial register on 22 February 2013.

Königs Wusterhausen, den 09. JULI 2014



CERTIFICACION NOTARIAL – SOCIEDAD

(Notary certificate – Corporation or Company)

Corno Notario Publico certifico que:

The undersigned Notary Public, certifies that:

ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH
& Co. Patente I KG i.L.
Berliner Straße 1
12529 Schönefeld / Waltersdorf / Germany

Que la Compañia otorgante de este poder/

The above mentioned Company /

existe y se encuentra organizada de acuerdo con las leyes de este pais /
estado/

exists and is organized in accordance with the Laws of this Country / State /

y la persona que en su representacion suscribe el presente mandato
cuenta con las debidas facultades para representarla en este acto.

*and the person who executed the forgoing document is the authorized representative of
said Corporation / Company and is empowered to execute this document on its behalf.*

Königs Wusterhausen, der 09. JULI 2014

Notario Publico
Notary Public

8

Hiermit beglaubige ich die vor mir vollzogenen Unterschriften

1. des Herrn Dietmar B e c k e r,
geboren am 6. November 1959,
wohnhaft in 10707 Berlin, Düsseldorfer Straße 60 A,
Herr Becker ist mir von Person bekannt,
2. des Herrn Michael S c h i n k,
geboren am 29. Januar 1971,
wohnhaft in 12157 Berlin, Begasstraße 6,
Herr Schink ist mir von Person bekannt.

Herr Becker und Herr Schink hier handelnd nicht im eigenen Namen, sondern ausschließlich als Geschäftsführer bzw. Prokurist der

ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH

mit Sitz in Schönefeld, eingetragen im Handelsregister des Amtsgerichts Cottbus, HRB-Nr. 10073 CB,

diese wiederum handelnd als persönlich haftende Gesellschafterin der

ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i.L.

mit Sitz in Schönefeld, eingetragen im Handelsregister des Amtsgerichts Cottbus, HRA-Nr. 2502 CB, mit der Geschäftsanschrift: Berliner Straße 1, 12529 Schönefeld.

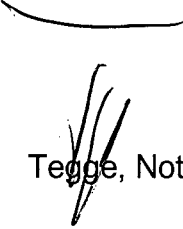
Ferner bescheinige ich, der beglaubigende Notar, aufgrund der Einsichtnahme vom 9. Juli 2014 in das Handelsregister des Amtsgerichts Cottbus

- unter HRB 10073 CB, dass Dietmar Becker und Michael Schink berechtigt sind, die ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH gemeinschaftlich zu vertreten und
- unter HRA 2502 CB, dass die ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH persönlich haftender Gesellschafter und Liquidator der ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG und zu deren alleinigen Vertretung berechtigt ist.

Königs Wusterhausen, den 09. Juli 2014

Urkundenrolle Nr. 1168/2014




Tegge, Notar

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Herrn Hans-Ulrich Tegge

3. in seiner Eigenschaft als Notar

4. versehen mit Siegel Hans-Ulrich Tegge, Notar in Königs
Wusterhausen.

Bestätigt

5. in Cottbus

6. am 15.07.2014

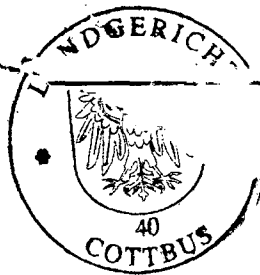
7. durch den Präsidenten des Landgerichts

8. unter Nr. 910E-1.277/14

9. Stempel/Siegel

10. Unterschrift


(Klaus-Christoph Clavée)



A QUIEN CORRESPONDA

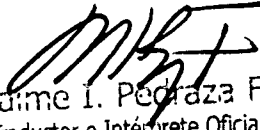
- ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG fue establecida el 5 de julio de 2006 y matriculada en el registro mercantil el 8 de septiembre de 2006.
- El objeto social de la compañía de inversiones es la adquisición de derechos de propiedad industrial, en particular patentes, y la venta de licencias exclusivas para dichos derechos de propiedad industrial para la administración, desarrollo y explotación de las mismas, esto último en particular por medio de licencias. La compañía de inversiones tiene derecho de llevar a efecto todas las transacciones y acciones legales adecuadas relacionadas con la promoción del objeto social de la compañía misma, o de encargar a terceros que lleven a efecto dichas transacciones.
- El término previsto de la participación es de cerca de 6 años (hasta el 31 de diciembre de 2012).
- El periodo de existencia de la compañía de inversiones finalizó el 31 de diciembre de 2012. Por tal razón, ha estado en liquidación desde el 1 de enero de 2013. La liquidación fue consignada en el registro mercantil el 22 de febrero de 2013.

Dado en Königs Wusterhausen, el 9 de julio de 2014

(Hay dos firmas)

Notas del Traductor:

- 1) El presente documento porta una autenticación notarial bilingüe (español-inglés y una Apostilla conforme a la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 dada en Cottbus, Alemania, el 15 de julio de 2014 con el No. 910E-1.277/14
- 2) Esta traducción se realizó en Bogotá, D.C., Colombia, el 19 de septiembre de 2014.


Jaime I. Pedraza F.
Traductor e Intérprete Oficial
Res. Minjusticia 1025 de 1995

A QUIEN CORRESPONDA

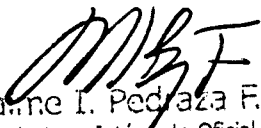
- ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG fue establecida el 5 de julio de 2006 y matriculada en el registro mercantil de Potsdam el 8 de septiembre de 2006.
- El objeto social es la adquisición de derechos de propiedad industrial, en particular patentes, y la venta de licencias exclusivas para dichos derechos de propiedad industrial para la administración, desarrollo y explotación de las mismas, esto último en particular por medio de licencias. La compañía de inversiones tiene derecho de llevar a efecto todas las transacciones y acciones legales adecuadas relacionadas con la promoción del objeto social de la compañía misma, o de encargar a terceros que lleven a efecto dichas transacciones.
- El término previsto de la participación es de cerca de 6 años (hasta el 31 de diciembre de 2012).
- El periodo de existencia de la compañía de inversiones finalizó el 31 de diciembre de 2012. Por tal razón, ha estado en liquidación desde el 1 de enero de 2013. La liquidación fue consignada en el registro mercantil el 22 de febrero de 2013.

Dado en Düsseldorf, el 12 de agosto de 2014

(Hay dos firmas)

Michael Kostka

Andre Bünterbroich


Jaime I. Pedraza F.
Traductor e Intérprete Oficial
Res. Minjusticia 1025 de 1995

Expediente No. 2226/2014 Op

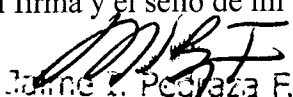
Yo, el abajo firmante, Dr. Rainer Oppermann, Notario Alemán, debidamente admitido y juramentado con domicilio oficial en Düsseldorf, por medio de la presente autentico la firma

- suscrita en mi presencia por el Sr. Michael Kostka, nacido el 6 de octubre de 1961, Königsallee 106, 40125 Düsseldorf, identificado con Cédula de Ciudadanía de Alemania.
- suscrita y reconocida por mí por el Sr. Andre Bundenbroich, nacido el 2 de octubre de 1971, Königsallee 106, 40125 Düsseldorf, identificado con Cédula de Ciudadanía de Alemania.

Por medio de la presente certifico y confirmo:

- **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH**, con domicilio registrado en Schönefeld (la "GmbH") es una compañía de responsabilidad limitada ("Gesellschaft mit beschränkter Haftung") debidamente constituida y existente bajo las leyes de la República Federal de Alemania, matriculada en el Registro Mercantil de Cottbus bajo el No. HRB 10077 CB.
- **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L.**, con domicilio registrado en Schönefeld (la "KG"), es una sociedad en comandita ("Kommanditgesellschaft") debidamente constituida y existente bajo las leyes de la República Federal de Alemania, matriculada en el Registro Mercantil de Cottbus bajo el No. HRA 2502 CB.
- **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH**, en su calidad de socia generalmente responsable ("persönlich haftender Gesellschafter") y Liquidadora está debidamente autorizada para representar y actuar legalmente para y a nombre de **ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i. L.** con autoridad única, exenta de la prohibición de actuar en su propio interés según lo previsto en la sección 181 del Código Civil Alemán.
- El Sr. Michael Kostka, en su calidad de signatario autorizado o funcionario con mandato registrado ("Prokurist") que ostenta el poder de vender y afectar predios, exento de la prohibición de actuar en su propio interés según lo previsto en la sección 181 del Código Civil Alemán y el Sr. Andre Bunterbroich en su calidad de signatario autorizado o funcionario con mandato registrado ("Prokurist") que ostenta el poder de vender y afectar predios, exento de la prohibición de actuar en su propio interés según lo previsto en la sección 181 del Código Civil Alemán, cuentan con la debida autorización para obrar conjuntamente en la representación y acción legal para y a nombre de la "GmbH" y por tal razón también para y a nombre de la "KG".

En testimonio de lo cual he estampado en la presente mi firma y el sello de mi despacho.


Juan C. Pedraza F.
Traductor e Intérprete Oficial
Res. Minjusticia 1025 de 1995

Düsseldorf, 12 de agosto de 2014

(Hay una firma, una estampilla y un cordón)

Dr. Oppermann

Notario

Notas del Traductor:

- 1) El presente documento porta una Apostilla conforme a la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 dada en Düsseldorf, Alemania, el 13 de agosto de 2014 con el No. 9101Ea-3888/2014
- 2) Esta traducción se realizó en Bogotá, D.C., Colombia, el 19 de septiembre de 2014.


Jaime I. Pedraza F.
Traductor e Intérprete Oficial
Res. Minjusticia 1025 de 1995

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS SOBRE PATENTE DE INVENCION

Andreas Rohardt, con número de identificación 129754305 de Alemania, Michael Jürgens con número de identificación 149348365 de Alemania, Ruth Maas con número de identificación 149348365 de Alemania and Tatjana Brossette con número de identificación 5837058105D, mayores de edad, domiciliados todos ellos en Alemania, en adelante **LOS CEDENTES**, por medio de la presente cesión, cedemos en forma voluntaria el cien por ciento (100%) de nuestros derechos, título e intereses en **COLOMBIA** sobre la invención titulada:

"Biocatalizadores de células enteras en la degradación de la biomasa celulósica"

El cien por ciento (100%) de nuestros derechos, título e intereses lo cedemos a **ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. PATENTE I KG i.L.**, sociedad domiciliada en 12529 Schönefeld / Waltersdorf, Alemania, quien se denominará como **EL CESIONARIO**.

Los **CEDENTES** declaran tener pleno derecho para efectuar el presente traspaso, que no han celebrado ni celebrarán ningún acuerdo que esté en conflicto con la presente cesión.

De igual manera los **CEDENTES** declaran que comunicarán al **CESIONARIO**, todos los hechos que conozcan con respecto a esta invención y que testificarán en cualquier proceso legal, firmarán todos los documentos legales y solicitudes divisionales de continuación y sustitución y reexpedición, prestarán todos los juramentos legales y en general harán todo

ASSINGMENT OF RIGHTS

Andreas Rohardt, adult, with Number of Identity 129754305 of Germany, Michael Jürgens, adult, with Number of Identity 149348365 of Germany, Ruth Maas, adult, with Number of Identity 149348365 of Germany, and Tatjana Brossette, adult, with Number of Identity 5837058105D, domiciled all of them in Germany, from now on the **ASSIGNORS**, through this assignment, we assign the one hundred percent (100%) of our rights, titles and interests in **COLOMBIA** on the patent application entitled:

"Whole-cell biocatalysts in the degradation of cellulosic biomass"

We assign the one hundred percent (100%) of our rights titles and interests to **ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. PATENTE I KG i.L.**, with domicile 12529 Schönefeld / Waltersdorf, Germany, from now on the **ASSIGNEE**.

The **ASSIGNORS** declare that they have full rights to make this transfer and state that they have not execute nor they will execute any agreements that conflicts with this assignment.

In the same way, the **ASSIGNORS** declare that they will communicate to the **ASSIGNEES** all the facts they know about this invention and that they will testify in any legal proceedings, will sign all legal documents and divisional applications, continuation, suspension and re-expedition, will provide all legal oaths and in general, will do every effort to enforce the proper protection of patent rights.

lo posible por hacer valer la debida protección de los derechos de la patente.

El presente documento se firma en _____ [city] a los _____ () días [days] del mes de **Abril** de **2014**.

Los cedentes,

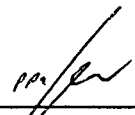
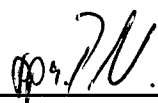
Andreas Rohardt,
No. identificación 129754305 de Alemania.

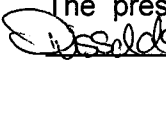
Michael Jürgens
No. identificación 149348365 de Alemania,

Ruth Maas
No. Identificación 149348365 de Alemania

Tatjana Brossette
No. identificación 5837058105D de Alemania

El cesionario,

 
[name:]
**ZYRUS BETEILIGUNGSGESELL-
SCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG i.L.**

The present document is signed in [city]  on April 7 2014.

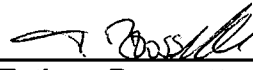
The assignors,

Andreas Rohardt,
Identification No. 129754305 of Germany,

Michael Jürgens
Identification No. 149348365 of Germany,

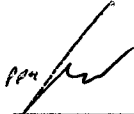


Ruth Maas
Identification No. 149348365 of Germany



Tatjana Brossette
Identification No. 5837058105D of Germany

The Assignee,

Kostka [name:] Buntbroich
**ZYRUS BETEILIGUNGSGESELL-
SCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG i.L.**

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS SOBRE PATENTE DE INVENCIÓN

Andreas Rohardt, con número de identificación 129754305 de Alemania, Michael Jürgens con número de identificación 149348365 de Alemania, Ruth Maas con número de identificación 149348365 de Alemania and Tatjana Brossette con número de identificación 5837058105D, mayores de edad, domiciliados todos ellos en Alemania, en adelante **LOS CEDENTES**, por medio de la presente cesión, cedemos en forma voluntaria el cien por ciento (100%) de nuestros derechos, título e intereses en **COLOMBIA** sobre la invención titulada:

“Biocatalizadores de células enteras en la degradación de la biomasa celulósica”

El cien por ciento (100%) de nuestros derechos, título e intereses lo cedemos a **ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. PATENTE I KG i.L.**, sociedad domiciliada en 12529 Schönefeld / Waltersdorf, Alemania, quien se denominará como **EL CESIONARIO**.

Los **CEDENTES** declaran tener pleno derecho para efectuar el presente traspaso, que no han celebrado ni celebrarán ningún acuerdo que esté en conflicto con la presente cesión.

De igual manera los **CEDENTES** declaran que comunicarán al **CESIONARIO**, todos los hechos que conozcan con respecto a esta invención y que testificarán en cualquier proceso legal, firmarán todos los documentos legales y solicitudes divisionales de continuación y sustitución y reexpedición, prestarán todos los juramentos legales y en general harán todo

ASSINGMENT OF RIGHTS

Andreas Rohardt, adult, with Number of Identity 129754305 of Germany, Michael Jürgens, adult, with Number of Identity 149348365 of Germany, Ruth Maas, adult, with Number of Identity 149348365 of Germany, and Tatjana Brossette, adult, with Number of Identity 5837058105D, domiciled all of them in Germany, from now on the **ASSIGNORS**, through this assignment, we assign the one hundred percent (100%) of our rights, titles and interests in **COLOMBIA** on the patent application entitled:

“Whole-cell biocatalysts in the degradation of cellulosic biomass”

We assign the one hundred percent (100%) of our rights titles and interests to **ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. PATENTE I KG i.L.**, with domicile 12529 Schönefeld / Waltersdorf, Germany, from now on the **ASSIGNEE**.

The **ASSIGNORS** declare that they have full rights to make this transfer and state that they have not execute nor they will execute any agreements that conflicts with this assignment.

In the same way, the **ASSIGNORS** declare that they will communicate to the **ASSIGNEES** all the facts they know about this invention and that they will testify in any legal proceedings, will sign all legal documents and divisional applications, continuation, suspension and re-expedition, will provide all legal oaths and in general, will do every effort to enforce the proper protection of patent rights.

lo posible por hacer valer la debida protección de los derechos de la patente.

El presente documento se firma en Herrnburg [city] a los 30 () días [days] del mes de **Abril** de **2014**.

Los cedentes,

[Signature]

Andreas Rohardt,
No. identificación 129754305 de Alemania.

Michael Jürgens
No. identificación 149348365 de Alemania,

Ruth Maas
No. Identificación 149348365 de Alemania

Tatjana Brossette
No. identificación 5837058105D de Alemania

El cesionario,

[Signature] [Signature]

[name:]
**ZYRUS BETEILIGUNGSGESELL-
SCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG i.L.**

The present document is signed in [city] Herrnburg on April 30 2014.

The assignors,

[Signature]

Andreas Rohardt,
Identification No. 129754305 of Germany,

Michael Jürgens
Identification No. 149348365 of Germany,

Ruth Maas
Identification No, 149348365 of Germany

Tatjana Brossette
Identification No. 5837058105D of Germany

The Assignee,

[Signature] [Signature]
Kostka Buntbroich
[name:]

**ZYRUS BETEILIGUNGSGESELL-
SCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG i.L.**

**CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHOS
SOBRE PATENTE DE INVENCION**

Andreas Rohardt, con número de identificación 129754305 de Alemania, Michael Jürgens con número de identificación 149348365 de Alemania, Ruth Maas con número de identificación 149348365 de Alemania and Tatjana Brossette con número de identificación 5837058105D, mayores de edad, domiciliados todos ellos en Alemania, en adelante **LOS CEDENTES**, por medio de la presente cesión, cedemos en forma voluntaria el cien por ciento (100%) de nuestros derechos, título e intereses en **COLOMBIA** sobre la invención titulada:

“Biocatalizadores de células enteras en la degradación de la biomasa celulósica”

El cien por ciento (100%) de nuestros derechos, título e intereses lo cedemos a **ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. PATENTE I KG i.L.**, sociedad domiciliada en 12529 Schönefeld / Waltersdorf, Alemania, quien se denominará como **EL CESIONARIO**.

Los **CEDENTES** declaran tener pleno derecho para efectuar el presente traspaso, que no han celebrado ni celebrarán ningún acuerdo que esté en conflicto con la presente cesión.

De igual manera los **CEDENTES** declaran que comunicarán al **CESIONARIO**, todos los hechos que conozcan con respecto a esta invención y que testificarán en cualquier proceso legal, firmarán todos los documentos legales y solicitudes divisionales de continuación y sustitución y reexpedición, prestarán todos los juramentos legales y en general harán todo lo posible por hacer valer la debida

ASSINGMENT OF RIGHTS

Andreas Rohardt, adult, with Number of Identity 129754305 of Germany, Michael Jürgens, adult, with Number of Identity 149348365 of Germany, Ruth Maas, adult, with Number of Identity 149348365 of Germany, and Tatjana Brossette, adult, with Number of Identity 5837058105D, domiciled all of them in Germany, from now on the **ASSIGNORS**, through this assignment, we assign the one hundred percent (100%) of our rights, titles and interests in **COLOMBIA** on the patent application entitled:

“Whole-cell biocatalysts in the degradation of cellulosic biomass”

We assign the one hundred percent (100%) of our rights titles and interests to **ZYRUS BETEILIGUNGSGESELLSCHAFT MBH & CO. PATENTE I KG i.L.**, with domicile 12529 Schönefeld / Waltersdorf, Germany, from now on the **ASSIGNEE**.

The **ASSIGNORS** declare that they have full rights to make this transfer and state that they have not execute nor they will execute any agreements that conflicts with this assignment.

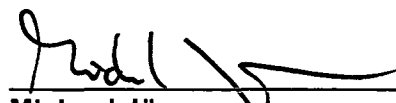
In the same way, the **ASSIGNORS** declare that they will communicate to the **ASSIGNEES** all the facts they know about this invention and that they will testify in any legal proceedings, will sign all legal documents and divisional applications, continuation, suspension and re-expedition, will provide all legal oaths and in general, will do every effort to enforce the proper protection of patent rights.

protección de los derechos de la patente.

El presente documento se firma en Hannover [city] a los 23 () días [days] del mes de **Abril** de **2014**.

Los cedentes,

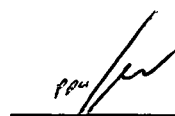
Andreas Rohardt,
No. identificación 129754305 de Alemania.


Michael Jürgens
No. identificación 149348365 de Alemania,

Ruth Maas
No. Identificación 149348365 de Alemania

Tatjana Brossette
No. identificación 5837058105D de
Alemania

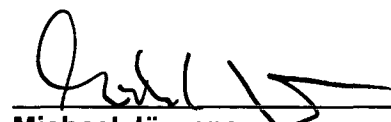
El cesionario,


[name:]
**ZYRUS BETEILIGUNGSGESELL-
SCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG i.L.**

The present document is signed in [city]
Hannover on April 23rd 2014.

The assignors,

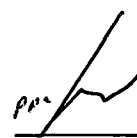
Andreas Rohardt,
Identification No. 129754305 of Germany,

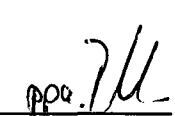

Michael Jürgens
Identification No. 149348365 of Germany,

Ruth Maas
Identification No, 149348365 of Germany

Tatjana Brossette
Identification No. 5837058105D of
Germany

The Assignee,


Kostka
[name:]
**ZYRUS BETEILIGUNGSGESELL-
SCHAFT MBH & CO.PATENTE I KG i.L.**


Bunttenbroich

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!

Bitte nicht für wissenschaftliche Publikationen (z.B. Beschreibung von Typstämmen) oder Patentzwecke verwenden!

DSMZ

LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

Inhoffenstr. 7 B
D-38124 Braunschweig
GERMANY

FORMBLATT für die
SICHERHEITSHINTERLEGUNG
vom Hinterleger auszufüllen

Von der Hinterlegungsstelle auszufüllen:

DSMZ-Aufnahmenummer:

Eingangsdatum der Kultur:

BAKTERIEN/ARCHAEA/PILZE¹

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Bezugszeichen: Exocellulase	Die zu hinterlegende Kultur ist: ☒ eine Reinkultur
Taxonomische Bezeichnung: Escherichia coli (B-Stamm)	☐ eine Mischkultur (max. zwei Komponenten)
II. ZÜCHTUNGSBEDINGUNGEN ()²	
Medium: pH	vor der Sterilisation 7
	Sterilisation 20 min bei 121 °C
LB, pH 7 mit 100 µg/ml Carbenicillin	pH nach Sterilisation: 7
	Verhalten gegenüber Sauerstoff:
	☒ aerob
	☐ mikroaerophil
	☐ obligat anaerob
	Besondere Ansprüche an die Gasatmosphäre:
	Bebrütungstemperatur: 37 °C
	Bebrütungsdauer: Standard (ÜN)
	Aufbewahrung bei: 4 °C
	Überimpfungsintervall: 2-3 Wochen

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik bzw. den Klassen 1 oder 2 entsprechend der Richtlinie 2009/41/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über die Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen in geschlossenen Systemen zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
-nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
Bitte nicht für wissenschaftliche Publikationen
 (z.B. Beschreibung von Typstämmen) oder Patentzwecke verwenden!

III. AUFBEWAHRUNGSBEDINGUNGEN	() ²
Glycerinkultur bei -80°C Aktivkultur 4°C	
IV. BEDINGUNGEN FÜR DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG	() ²
Kultivierung in LB mit 100 µg/ml Carbenicillin bei 37°C, pH 7	
V. BESTANDTEILE DER MISCHKULTUR (wenn zutreffend)	() ²
Beschreibung der Bestandteile (max. zwei Komponenten): Verfahren, die die Prüfung auf Lebensfähigkeit der Bestandteile ermöglichen:	
VI. EIGENSCHAFTEN, DIE FÜR DIE GESUNDHEIT ODER DIE UMWELT GEFÄHRLICH SIND () ²	
Risikogruppe des Mikroorganismus gemäß <u>TRBA</u> (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (<u>TRBA 466</u>) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (<u>TRBA 460</u>): (x) Risikogruppe 1 () Risikogruppe 2 bei gentechnisch veränderten Mikroorganismen: Sicherheitsstufe nach dem <u>Gesetz zur Regelung der Gentechnik</u> : (x) S1 () S2 Der zu hinterlegende Mikroorganismus darf unter folgenden Laborsicherheitsmaßnahmen ¹ gehandhabt werden: (x) L1 () L2 Der Mikroorganismus hat folgende Eigenschaften, die für die Gesundheit oder die Umwelt gefährlich sind oder sein können: Bitte angeben: ☒ Dem Unterzeichneten sind derartige Eigenschaften nicht bekannt.	

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460)). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
 -nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

VII. ANGABEN ZUM GENTECHNISCH VERÄNDERTEN MIKROORGANISMUS () ²			
1. ANGABEN ZUM EMPFÄNGERORGANISMUS			
Bezeichnung:	E. coli BL21		
Risikogruppe ¹ :	☒ RG1	☐ RG2	
Sensitivitäten:			
Resistenzen:			
Auxotrophien:			
besondere Eigenschaften: B; F ⁻ , dcm, opmT, hsdS(rB-mB-) gal (z.B. Restriktions-/Modifikationssystem, generelle genetische Rekombination)			
2. ANGABEN ZUM SPENDERORGANISMUS			
Bezeichnung:	Clostridium thermocellum		
Risikogruppe ¹ :	☒ RG1	☐ RG2	☐ RG3
Beschreibung des klonierten DNA-Fragments:			
Informationsgehalt:	Exocellulase		
Größe (in bp):	2382 bp		
	☐ vollständiges Genom	☐ cDNA	
	☐ subgenomisch	☒ synthetisch	
	☐ subgenisch		
Gefahrenpotential der klonierten DNA:	☐ pathogen	☐ tumorigen	
	☐ toxisch	☐ allergen	
☒ kein Gefahrenpotential			
3. ANGABEN ZUM VEKTOR			
Bezeichnung:	pBAD-AT-CelK		
Abkömmling (Derivat) von:	pBAD/gIIIa		
Wirtsspezifität:	E. coli		
Resistenzen:	Ampicillin		
Größe des Plasmids (in bp):	ohne Insert: 5439 bp	mit Insert: 7821 bp	
Promotoren:	araBAD-Promotor		
weitere vorhandene Leseramen:	araC		
Angaben zu Mobilisierbarkeit und eigenen Transfer-Systemen: /			
Angaben zur eigenen Infektiosität: /			
Möglichkeit des Transfers durch endogene Helferviren: /			
4. ANGABEN ZUM GVO¹			
besondere Eigenschaften: (z.B. Produktion von ...; Einsatz als ...-Vektor etc.) Einsatz als Ganzzellbiokatalysator			
Fremd-DNA:	☐ chromosomal integriert	☒ episomal	
Gefahrenpotential:	☐ pathogen	☐ tumorigen	
	☐ toxisch	☐ allergen	
☒ kein Gefahrenpotential bitte begründen:			
KLASSIFIZIERUNG NACH GENTG:	☒ S1	☐ S2	
<i>Die Hinterlegung eines gentechnisch veränderten Organismus der Sicherheitsstufe 2 kann gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik nur in Kraft treten, wenn der DSMZ eine Kopie der Ergebnisse der Sicherheitsüberprüfung durch die zuständige Behörde vom Hinterleger zugesandt wird.</i>			

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der der Gentechnik zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem besonderen Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
-nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

23

Unterschrift(en):

³ Dieses Hinterlegungsformblatt ist der Vertrag zwischen Hinterleger und Hinterlegungsstelle und muss daher vom Hinterleger unterzeichnet werden. Bei Firmen wird empfohlen, dass zwei offizielle Firmenvertreter unterschreiben. Wenn nicht anders vereinbart, ist der Unterzeichner Korrespondenzpartner der DSMZ. Durch die Angabe der E-Mail-Adresse wird die Korrespondenz beschleunigt.

SICHERHEITSHINTERLEGUNG – BAKTERIEN/ARCHAEA/PILZE (vierte und letzte Seite) 01/2012

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD

**No utilizar en publicaciones científicas (p. ej. descripción de tipos de cepas)
o para fines de patentes.**



LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN
GmbH

(«Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares», DSMZ)

Inhoffenstr. 7 B

D-38124 Braunschweig

ALEMANIA

FORMULARIO para el
**DEPÓSITO DE
SEGURIDAD** a rellenar por
el depositante

A rellenar por la parte depositaria:

Número de entrada DSMZ:

Fecha de entrada del cultivo:

BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS¹

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia: Exocelulasa	El cultivo a depositar es: (x) cultivo puro () cultivo mixto (máx. dos componentes)
Denominación taxonómica: Escherichia coli (cepa B)	
II. CONDICIONES DE CULTIVO () ²	
Medio: LB, pH 7 con 100 µg/ml de carbenicilina	pH antes de la esterilización: 7 Esterilización 20 minutos a 121 °C pH tras la esterilización: 7 Comportamiento frente al oxígeno: (x) aerobio () microaerófilo () anaerobio obligado Condiciones especiales en la atmósfera: Temperatura de incubación: 37 °C Periodo de incubación: estándar (pernoctación) Conservación a: 4 °C Intervalo de inoculación: de 2 a 3 semanas

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 según la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. TRBA: Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (TRBA 466) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (TRBA 469). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o las clases 1 o 2 correspondientes a la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo sobre la utilización de microorganismos modificados genéticamente en sistemas cerrados.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

DEPÓSITO DE SEGURIDAD - BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS (primera página) 01/2012

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD

**No utilizar en publicaciones científicas (p. ej. descripción de tipos de cepas)
o para fines de patentes.**

III. CONDICIONES DE CONSERVACIÓN	() ²
Cultivo de glicerina a -80 °C Cultivo activo 4 °C	
IV. CONDICIONES PARA LA COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD	() ²
Cultivo en LB con 100 µg/ml de carbenicilina a 37 °C, pH 7	
V. COMPONENTES DEL CULTIVO MIXTO (si corresponde)	() ²
Descripción de los componentes (máx. dos componentes): Procedimientos que permiten la comprobación de la viabilidad de los componentes:	
VI. CARACTERÍSTICAS PELIGROSAS PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE	() ²
Grupo de riesgo del microorganismo según <u>TRBA</u> (Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (<u>TRBA 466</u>) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (<u>TRBA 460</u>) ¹ ☒ Grupo de riesgo 1 ☐ Grupo de riesgo 2 en el caso de microorganismos modificados genéticamente: Niveles de seguridad según la <u>Ley alemana de regulación de ingeniería genética</u> : ☒ S1 ☐ S2 El microorganismo a depositar ha de poder manipularse bajo las siguientes medidas de seguridad en el laboratorio ¹ : ☒ L1 ☐ L2 El microorganismo contiene las siguientes características que son o pueden ser peligrosas para la salud o el medio ambiente: Especificar: ☒ El firmante desconoce la existencia de características de dicho tipo.	

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 según la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. TRBA: Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (TRBA 466) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (TRBA 460). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

28

VII. DATOS DEL MICROORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE		()
1. DATOS DEL ORGANISMO RECEPTOR		
Denominación: E. coli BL21		
Grupo de riesgo ¹ :	(x) GR1	() GR2
Sensibilidades:		
Resistencias:		
Auxótrofos:		
Características especiales: B; F-, dcm, opmT, hsdS(rB-mB-) gal		
(p. ej. sistema de restricción/modificación, recombinación genética general)		
2. DATOS DEL ORGANISMO DONANTE		
Denominación: Clostridium thermocellum		
Grupo de riesgo ¹ :	(x) GR1	() GR2 () GR3
Descripción del fragmento de ADN clonado:		
Contenido informativo:	Exocelulasa	
Tamaño (en par de base):	2382 pares de base	
	() genoma completo	() cDNA
	() subgenómico	(x) sintético
	() subgénico	
Riesgo potencial del ADN clonado:	() patógeno	() tumorigénico
	() toxigénico	() alérgico
(x) sin riesgo potencial		
3. DATOS DEL VECTOR		
Denominación:	pBAD-AT-CelK	
Derivado de:	pBAD/gIIA	
Especificidad del hospedador:	E. coli	
Resistencias:	Ampicilina	
Tamaño del plásmido (en par de base):	sin inserto: 5439 pares de base	con inserto: 7821 pares de base
Promotores:	Promotor araBAD	
Otros marcos de lectura disponibles:	araC	
Datos de la movilidad y los sistemas propios de transferencia:	/	
Datos de la infecciosidad propia:	/	
Possibilidad de transferencia mediante virus auxiliares endógenos:	/	
4. DATOS DEL OMG²		
Características especiales:		
(p. ej. producción de...; uso como vector... etc.) Uso como biocatalizador de células completas		
ADN extraño:	() cromosomal integrado	(x) episomal
Riesgo potencial:	() patógeno	() tumorigénico
	() toxigénico	() alérgico
(x) sin riesgo potencial		
justificar:		
CLASIFICACIÓN SEGÚN LA LEY ALEMANA DE INGENIERÍA GENÉTICA: (X) S1 () S2		
De acuerdo con la <u>Ley alemana de ingeniería genética</u> , solo se puede efectuar el depósito de un organismo modificado genéticamente de nivel de seguridad 2 si el depositario ha enviado a la DSMZ una copia de los resultados del control de seguridad a través de las autoridades correspondientes.		

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 en la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. IRBA: Guía técnica para agentes biológicos); 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (IRBA 466) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (IRBA 460). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD

**No utilizar en publicaciones científicas (p. ej. descripción de tipos de cepas)
o para fines de patentes.**

VIII. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA	() ²
Expresión de superficie de una exocelulasa en <i>E. coli</i>	
IX. INFORMACIÓN ADICIONAL	() ²
X. DEPOSITARIO³ El microorganismo descrito ha sido enviado para el depósito de seguridad. Los cultivos de la cepa son propiedad del depositario. La cepa no se enumerará en los registros públicos de la DSMZ sino que se procesará de forma estrictamente confidencial. No se proporcionará la cepa a terceros sin la autorización por escrito del depositario. El depósito de seguridad <u>no</u> es adecuado para fines de patente y <u>no</u> se aceptará con fines de publicación científica. Un <i>tipo de cepa</i> futuro para la descripción de un nuevo tipo se ha de depositar en la colección pública de la DSMZ (<u>formulario de inscripción</u>). Institución/empresa: ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG I.L. Nombre del firmante (en letras de imprenta): Becker Kostka [manuscrito] El firmante deposita: (x) en nombre de institución/empresa () como depositario privado Dirección: Berliner Strasse 1 12529 Schönefeld Firma: [firma ilegible] Teléfono: 030/6331108- Fax: 030/6331108-20 Correo electrónico: Fecha: 24/09/2013 [manuscrito]	

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

³ Este formulario de depósito es un contrato entre el depositante y el lugar del depósito y por tanto ha de ser firmado por el depositante. Se recomienda la firma de dos representantes. Si no se acuerda lo contrario, el firmante es corresponsal de la DSMZ. Introduciendo la dirección de correo electrónico se acelerará la correspondencia.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!

Bitte nicht für wissenschaftliche Publikationen (z.B. Beschreibung von Typstämmen) oder Patentzwecke verwenden!

DSMZ

LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

Inhoffenstr. 7 B
D-38124 Braunschweig
GERMANY

FORMBLATT für die

SICHERHEITSHINTERLEGUNG

vom Hinterleger auszufüllen

Von der Hinterlegungsstelle auszufüllen:

DSMZ-Aufnahmenummer: 27765

Eingangsdatum der Kultur: 19.09.2013

BAKTERIEN/ARCHAEA/PILZE¹

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS

Bezugszeichen:

Endocellulase

Die zu hinterlegende Kultur ist:

(☒) eine Reinkultur

Taxonomische Bezeichnung:

Escherichia coli (B-Stamm)

() eine Mischkultur

(max. zwei Komponenten)

II. ZÜCHTUNGSBEDINGUNGEN

()²

Medium: pH

vor der Sterilisation 7

Sterilisation 20 min bei 121 °C

LB, pH 7 mit 100 µg/ml Carbenicillin

pH nach Sterilisation: 7

Verhalten gegenüber Sauerstoff:

(☒) aerob

() mikroaerophil

() obligat anaerob

Besondere Ansprüche an die Gasatmosphäre:

Bebrütungstemperatur: 37 °C

Bebrütungsdauer: Standard (ÜN)

Aufbewahrung bei: 4 °C

Überimpfungsintervall: 2-3 Wochen

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik bzw. den Klassen 1 oder 2 entsprechend der Richtlinie 2009/41/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über die Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen in geschlossenen Systemen zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!

-nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

SICHERHEITSHINTERLEGUNG – BAKTERIEN/ARCHAEEN/PILZE (zweite Seite) 01/2012

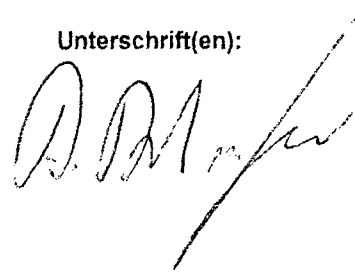
VII. ANGABEN ZUM GENTECHNISCH VERÄNDERTEN MIKROORGANISMUS		() ²
1. ANGABEN ZUM EMPFÄNGERORGANISMUS		
Bezeichnung: E. coli BL21(DE3)		
Risikogruppe ¹ :	(x) RG1	() RG2
Sensitivitäten:		
Resistenzen:		
Auxotrophien:		
besondere Eigenschaften: B; F-, dcm, opmT, hsdS(rB-mB-) gal, Lambda(DE) (z.B. Restriktions-/Modifikationssystem, generelle genetische Rekombination)		
2. ANGABEN ZUM SPENDERORGANISMUS		
Bezeichnung: Bacillus subtilis		
Risikogruppe ¹ :	(x) RG1	() RG2 () RG3
Beschreibung des klonierten DNA-Fragments:		
Informationsgehalt:	Endocellulase	
Größe (in bp):	1422 bp	
	() vollständiges Genom	() cDNA
	() subgenomisch	(x) synthetisch
	() subgenisch	
Gefahrenpotential der klonierten DNA:	() pathogen	() tumorigen
	() toxisch	() allergen
(x) kein Gefahrenpotential		
3. ANGABEN ZUM VEKTOR		
Bezeichnung: pET-AT-Cel5A		
Abkömmling (Derivat) von: pET-11d		
Wirtsspezifität: E. coli		
Resistenzen: Ampicillin		
Größe des Plasmids (in bp):	ohne Insert: 7070 bp	mit Insert: 8492 bp
Promotoren: T7lac Promotor		
weitere vorhandene Leserahmen: LacI		
Angaben zu Mobilisierbarkeit und eigenen Transfer-Systemen:		
Angaben zur eigenen Infektiosität:		
Möglichkeit des Transfers durch endogene Helferviren:		
4. ANGABEN ZUM GVO¹		
besondere Eigenschaften: (z.B. Produktion von ...; Einsatz als ...-Vektor etc.) Einsatz als Ganzzellbiokatalysator		
Fremd-DNA:	() chromosomal integriert	(x) episomal
Gefahrenpotential:	() pathogen	() tumorigen
	() toxisch	() allergen
(x) kein Gefahrenpotential bitte begründen:		
KLASSIFIZIERUNG NACH GENTG:	(x) S1	() S2
<i>Die Hinterlegung eines gentechnisch veränderten Organismus der Sicherheitsstufe 2 kann gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik nur in Kraft treten, wenn der DSMZ eine Kopie der Ergebnisse der Sicherheitsüberprüfung durch die zuständige Behörde vom Hinterleger zugesandt wird.</i>		

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der der Gentechnik zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem besonderen Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
-nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
Bitte nicht für wissenschaftliche Publikationen
 (z.B. Beschreibung von Typstämmen) oder Patentzwecke verwenden!

VIII. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG	() ²
Oberflächenexpression einer Endocellulase auf E. coli	
IX. WEITERE ANGABEN	() ²
X. HINTERLEGER³	
Der oben beschriebene Mikroorganismus wird zur Sicherheitshinterlegung eingeschickt. Kulturen des Stammes bleiben Eigentum des Hinterlegers. Der Stamm wird nicht im öffentlichen Bestand der DSMZ gelistet sondern streng vertraulich bearbeitet. Ohne die schriftliche Aufforderung durch den Hinterleger wird der Stamm nicht an Dritte abgegeben. Die Sicherheitshinterlegung ist <u>nicht</u> für Patentzwecke geeignet und wird <u>nicht</u> für die Zwecke wissenschaftlicher Publikationen akzeptiert. Ein zukünftiger <u>Typstamm</u> zur Beschreibung einer neuen Art muss in der öffentlichen Sammlung der DSMZ hinterlegt werden (<u>Aufnahmeformular</u>). Institution/Firma: ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbh & Co. Patente I KG i.L. Name der unterzeichnenden Person(en) (in Druckbuchstaben): Becker Kostka Die unterzeichnende(n) Person(en) hinterlegt/hinterlegen: Anschrift: Berliner Straße 1 12529 Schönefeld Telefon: 030/6331108- Fax: 030/6331108-20 E-Mail: () im Namen der Institution/ Firma () als Privathinterleger Unterschrift(en):  Datum: 24.09.2013	

² Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

³ Dieses Hinterlegungsformblatt ist der Vertrag zwischen Hinterleger und Hinterlegungsstelle und muss daher vom Hinterleger unterzeichnet werden. Bei Firmen wird empfohlen, dass zwei offizielle Firmenvertreter unterschreiben. Wenn nicht anders vereinbart, ist der Unterzeichner Korrespondenzpartner der DSMZ. Durch die Angabe der E-Mail-Adresse wird die Korrespondenz beschleunigt.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
 -nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

32

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD

**No utilizar en publicaciones científicas (p. ej. descripción de tipos de cepas)
o para fines de patentes.**

DSMZ



LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND
ZELLKULTUREN GmbH

(«Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares», DSMZ)

Inhoffenstr. 7 B

D-38124 Braunschweig

ALEMANIA

FORMULARIO para el
**DEPÓSITO DE
SEGURIDAD** a rellenar por
el depositante

S80-2013
[manuscrito]

A rellenar por la parte depositaria:

Número de entrada DSMZ: 27765 [manuscrito]

Fecha de entrada del cultivo: 19/09/2013 [manuscrito]

BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS¹

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia: Endocelulasa	El cultivo a depositar es: (x) cultivo puro () cultivo mixto (máx. dos componentes)
Denominación taxonómica: Escherichia coli (cepa B)	
II. CONDICIONES DE CULTIVO () ²	
Medio: LB, pH 7 con 100 µg/ml de carbenicilina	pH antes de la esterilización 7 Esterilización 20 minutos a 121 °C pH tras la esterilización: 7 Comportamiento frente al oxígeno: (x) aerobio () microaerófilo () anaerobio obligado Condiciones especiales en la atmósfera: Temperatura de incubación: 37 °C Periodo de incubación: estándar (pernoctación) Conservación a: 4 °C Intervalo de inoculación: de 2 a 3 semanas

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 según la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. TRBA: Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (TRBA 466) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (TRBA 460). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o las clases 1 o 2 correspondientes a la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo sobre la utilización de microorganismos modificados genéticamente en sistemas cerrados.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

DEPÓSITO DE SEGURIDAD -- BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS (primera página) 01/2012

VII. DATOS DEL MICROORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE		() ²
1. DATOS DEL ORGANISMO RECEPTOR		
Denominación: E. coli BL21(DE3)		
Grupo de riesgo ¹ : (x) GR1 () GR2		
Sensibilidades:		
Resistencias:		
Auxótrofos:		
Características especiales: B; F-, dcm, opmT, hsdS(rB-mB-) gal, Lambda(DE)		
(p. ej. sistema de restricción/modificación, recombinación genética general)		
2. DATOS DEL ORGANISMO DONANTE		
Denominación: Bacillus subtilis		
Grupo de riesgo ¹ : (x) GR1 () GR2 () GR3		
Descripción del fragmento de ADN clonado:		
Contenido informativo:	Endocelulasa	
Tamaño (en par de base):	1422 pares de base	
	() genoma completo	() cDNA
	() subgenómico	(x) sintético
	() subgénico	
Riesgo potencial del ADN clonado:		
	() patógeno	() tumorigénico
	() toxigénico	() alérgico
(x) sin riesgo potencial		
3. DATOS DEL VECTOR		
Denominación: pET-AT-Cel5A		
Derivado de: pET-11d		
Especificidad del hospedador: E. coli		
Resistencias: Ampicilina		
Tamaño del plásmido (en par de base): sin inserto: 7070 pares de base con inserto: 8492 pares de base		
Promotores: Promotor T7lac		
Otros marcos de lectura disponibles: LacI		
Datos de la movilidad y los sistemas propios de transferencia: /		
Datos de la infecciosidad propia: /		
Posibilidad de transferencia mediante virus auxiliares endógenos: /		
4. DATOS DEL OMG²		
Características especiales:		
(p. ej. producción de...; uso como vector... etc.) Uso como biocatalizador de células completas		
ADN extraño: () cromosomal integrado (x) episomal		
Riesgo potencial: () patógeno () tumorigénico		
	() toxigénico	() alérgico
(x) sin riesgo potencial		
justificar:		
CLASIFICACIÓN SEGÚN LA LEY ALEMANA DE INGENIERÍA GENÉTICA: (x) S1 () S2		
De acuerdo con la <u>Ley alemana de ingeniería genética</u> , solo se puede efectuar el depósito de un organismo modificado genéticamente de nivel de seguridad 2 si el depositario ha enviado a la DSMZ una copia de los resultados del control de seguridad a través de las autoridades correspondientes.		

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 en la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. TRBA: Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (TRBA 466) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (TRBA 460). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD

**No utilizar en publicaciones científicas (p. ej. descripción de tipos de cepas)
o para fines de patentes.**

VIII. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA	() ²
Expresión de superficie de una endocelulasa en <i>E. coli</i>	
IX. INFORMACIÓN ADICIONAL	()
X. DEPOSITARIO ³	
El microorganismo descrito ha sido enviado para el depósito de seguridad. Los cultivos de la cepa son propiedad del depositario. La cepa no se enumerará en los registros públicos de la DSMZ sino que se procesará de forma estrictamente confidencial. No se proporcionará la cepa a terceros sin la autorización por escrito del depositario. El depósito de seguridad <u>no</u> es adecuado para fines de patente y <u>no</u> se aceptará con fines de publicación científica. Un tipo de cepa futuro para la descripción de un nuevo tipo se ha de depositar en la colección pública de la DSMZ (formulario de inscripción). Institución/empresa: ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i.L. Nombre del firmante (en letras de imprenta): Becker Kostka [manuscrito] El firmante deposita: () en nombre de institución/empresa () como depositario privado Dirección: Berliner Strasse 1 Firma: [firma ilegible] 12529 Schönerfeld Teléfono: 030/6331108- Fax: 030/6331108-20 Correo electrónico: Fecha: 24/09/2013 [manuscrito]	

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

³ Este formulario de depósito es un contrato entre el depositante y el lugar del depósito y por tanto ha de ser firmado por el depositante. Se recomienda la firma de dos representantes. Si no se acuerda lo contrario, el firmante es corresponsal de la DSMZ. Introduciendo la dirección de correo electrónico se acelerará la correspondencia.

**SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)**



SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
No utilizar en publicaciones científicas (p. ej. descripción de tipos de cepas)
o para fines de patentes.

LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH
(«Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares», DSMZ)
Inhoffenstr. 7 B
D-38124 Braunschweig
ALEMANIA

FORMULARIO para el

DEPÓSITO DE

SEGURIDAD a rellenar por el depositante

S81-2013
[manuscrito]

A rellenar por la parte depositaria:

Número de entrada DSMZ: 27766 [manuscrito]

Fecha de entrada del cultivo: DSMZ/Patents
culture received [sello]
19 sept. 2013 [sello]

BACTERIAS/ARQUEAS/HONGOS¹

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia: Beta-glucosidasa	El cultivo a depositar es: (x) cultivo puro () cultivo mixto (máx. dos componentes)
Denominación taxonómica: Escherichia coli (cepa B)	
II. CONDICIONES DE CULTIVO () ²	
Medio: LB, pH 7 con 100 µg/ml de carbenicilina	pH antes de la esterilización: 7 Esterilización 20 minutos a 121 °C pH tras la esterilización: 7 Comportamiento frente al oxígeno: (x) aerobio () microaerófilo () anaerobio obligado Condiciones especiales en la atmósfera: Temperatura de incubación: 37 °C Periodo de incubación: estándar (pernoctación) Conservación a: 4 °C Intervalo de inoculación: de 2 a 3 semanas

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 según la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. TRBA: Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (TRBA 456) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (TRBA 460). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética o las clases 1 o 2 correspondientes a la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo sobre la utilización de microorganismos modificados genéticamente en sistemas cerrados.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
No utilizar en publicaciones científicas (p. ej. descripción de tipos de cepas)
o para fines de patentes.

III. CONDICIONES DE CONSERVACIÓN	() ²
Cultivo de glicerina a -80 °C Cultivo activo 4 °C	
IV. CONDICIONES PARA LA COMPROBACIÓN DE LA VIABILIDAD	() ²
Cultivo en LB con 100 µg/ml de carbenicilina a 37 °C, pH 7	
V. COMPONENTES DEL CULTIVO MIXTO (si corresponde)	() ²
Descripción de los componentes (máx. dos componentes):	
Procedimientos que permiten la comprobación de la viabilidad de los componentes:	
VI. CARACTERÍSTICAS PELIGROSAS PARA LA SALUD O EL MEDIO AMBIENTE	() ²
Grupo de riesgo del microorganismo según <u>TRBA</u> (Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (<u>TRBA 466</u>) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (<u>TRBA 460</u>)¹ (x) Grupo de riesgo 1 () Grupo de riesgo 2 en el caso de microorganismos modificados genéticamente: Niveles de seguridad según la <u>Ley alemana de regulación de ingeniería genética</u>: (x) S1 () S2 El microorganismo a depositar ha de poder manipularse bajo las siguientes medidas de seguridad en el laboratorio¹: (x) L1 () L2 El microorganismo contiene las siguientes características que son o pueden ser peligrosas para la salud o el medio ambiente: Especificar: (X) El firmante desconoce la existencia de características de dicho tipo.	

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 según la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. TRBA: Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (TRBA 466) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (TRBA 460). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

VII. DATOS DEL MICROORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE		() ²
1. DATOS DEL ORGANISMO RECEPTOR		
Denominación: E. coli BL21(DE3)		
Grupo de riesgo ¹ :	☒ GR1	☐ GR2
Sensibilidades:		
Resistencias:		
Auxótrofos:		
Características especiales: B; F-, dcm, opmT, hsdS(rB-mB-) gal, Lambda(DE)		
(p. ej. sistema de restricción/modificación, recombinación genética general)		
2. DATOS DEL ORGANISMO DONANTE		
Denominación: Bacillus subtilis		
Grupo de riesgo ¹ :	☒ GR1	☐ GR2 ☐ GR3
Descripción del fragmento de ADN clonado:		
Contenido informativo:	Beta-glucosidasa	
Tamaño (en par de base):	1353 pares de base	
	☐ genoma completo	☐ cDNA
	☐ subgenómico	☒ sintético
	☐ subgénico	
Riesgo potencial del ADN clonado:		
	☐ patógeno	☐ tumorigénico
	☐ toxigénico	☐ alergénico
☒ sin riesgo potencial		
3. DATOS DEL VECTOR		
Denominación: pET-AT-BglA		
Derivado de: pET-11d		
Especificidad del hospedador: E. coli		
Resistencias: Ampicilina		
Tamaño del plásmido (en par de base): sin inserto: 7070 pares de base con inserto: 8423 pares de base		
Promotores: Promotor T7lac		
Otros marcos de lectura disponibles: LacI		
Datos de la movilidad y los sistemas propios de transferencia: /		
Datos de la infecciosidad propia: /		
Posibilidad de transferencia mediante virus auxiliares endógenos: /		
4. DATOS DEL OMG¹		
Características especiales:		
(p. ej. producción de...; uso como vector... etc.) Uso como biocatalizador de células completas		
ADN extraño:	☐ cromosomal integrado	☒ episomal
Riesgo potencial:	☐ patógeno	☐ tumorigénico
	☐ toxigénico	☐ alergénico
☒ sin riesgo potencial		
justificar:		
CLASIFICACIÓN SEGÚN LA LEY ALEMANA DE INGENIERÍA GENÉTICA: ☒ S1 ☐ S2		
De acuerdo con la <u>Ley alemana de ingeniería genética</u> , solo se puede efectuar el depósito de un organismo modificado genéticamente de nivel de seguridad 2 si el depositario ha enviado a la DSMZ una copia de los resultados del control de seguridad a través de las autoridades correspondientes.		

¹ La DSMZ solo acepta para el depósito aquellos microorganismos que han sido clasificados como grupo de riesgo 1 y 2 en la Directiva sobre sustancias biológicas (cf. TRBA: Guía técnica para agentes biológicos): 'Clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo' (TRBA 465) y 'Clasificación de hongos en grupos de riesgo' (TRBA 460). Los organismos modificados genéticamente deben poder clasificarse dentro de los niveles de seguridad S1 o S2 correspondientes a la Ley alemana de regulación de ingeniería genética.

² Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

SOLO PARA DEPÓSITOS DE SEGURIDAD
(No para fines de patentes o publicaciones científicas)

VIII. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA ⁵		() ⁵
Expresión de superficie de una beta-glucosidasa en E. coli		
IX. INFORMACIÓN ADICIONAL ⁷		() ⁶
X. ESTADO DEL CULTIVO TRANSCURRIDO EL PERÍODO DE CONSERVACIÓN DESCRITO ⁸		
a) El cultivo ha de pasar a formar parte del registro público de la DSMZ	() sí () no	
b) El cultivo se ha de devolver al depositario a cambio de pago	() sí () no	
c) La DSMZ ha de destruir el cultivo	() sí () no	
XI. DEPOSITARIO ¹⁰		
Institución/empresa: ZYRUS Beteiligungsgesellschaft mbH & Co. Patente I KG i.L. Nombre del firmante (en letras de imprenta): BECKER LUUK [manuscrito] El firmante deposita: () en nombre de institución/empresa () como depositario privado Dirección: Berliner Strasse 1 Firma: 12529 Schönefeld [firmas ilegibles] Teléfono: 030/6331108-0 Fax: 030/6331108-20 Correo electrónico: ganzzellkatalysator@patentefonds [manuscrito] Fecha:		

⁵ Marcar con una X en caso de que se facilite más información en una hoja aparte.

⁶ Se recomienda introducir la descripción científica o la denominación taxonómica propuesta (bajo I.) del microorganismo.

⁷ Si lo desea puede introducir el nombre y dirección del inventor.

⁸ Marcar con una X en caso de que se facilite más información (exceptuando la mencionada en la nota a pie de página 5) en una hoja aparte, como por ejemplo el origen del microorganismo, el nombre y la dirección de otros lugares de depósito en los que se haya depositado el microorganismo o el criterio aplicado para el establecimiento de la denominación taxonómica propuesta. (Estos datos son facultativos).

⁹ El período de conservación según el Tratado de Budapest es de un mínimo de cinco años desde la entrada de la última solicitud en caso de prueba del organismo depositado; en cualquier caso, de un mínimo de 30 años tras el momento del depósito (Norma 9.1 del TRATADO DE BUDAPEST). La normativa aquí establecida es válida hasta que se establezca jurisdicción al respecto.

¹⁰ Este formulario de depósito es un contrato entre el depositante y el lugar del depósito y por tanto ha de ser firmado por el depositante. Se recomienda la firma de dos representantes. Si no se acuerda lo contrario, el firmante es corresponsal de la DSMZ. Introduciendo la dirección de correo electrónico se acelerará la correspondencia.

DSMZ/Patents
document received [sello]
30 oct. 2013 [sello]

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!

Bitte nicht für wissenschaftliche Publikationen (z.B. Beschreibung von Typstämmen) oder Patentzwecke verwenden!

DSMZ

LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

Inhoffenstr. 7 B
D-38124 Braunschweig
GERMANY

FORMBLATT für die SICHERHEITSHINTERLEGUNG

vom Hinterleger auszufüllen

581-2013

Von der Hinterlegungsstelle auszufüllen:

DSMZ-Aufnahmenummer:

2776

Eingangsdatum der Kultur:

DSMZ / Patents
culture received

19. Sep. 2013

BAKTERIEN/ARCHAEA/PILZE¹

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Bezugszeichen: beta-Glukosidase	Die zu hinterlegende Kultur ist: (☒) eine Reinkultur () eine Mischkultur (max. zwei Komponenten)
Taxonomische Bezeichnung: Escherichia coli (B-Stamm)	
II. ZÜCHTUNGSBEDINGUNGEN () ²	
Medium: pH	vor der Sterilisation: 7
	Sterilisation: 20 min bei 121 °C
LB, pH 7 mit 100 µg/ml Carbenicillin	pH nach Sterilisation: 7
	Verhalten gegenüber Sauerstoff: (☒) aerob () mikroaerophil () obligat anaerob
	Besondere Ansprüche an die Gasatmosphäre:
	Bebrütungstemperatur: 37 °C
	Bebrütungsdauer: Standard (ÜN)
	Aufbewahrung bei: 4 °C
	Überimpfungsintervall: 2-3 Wochen

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460)). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik bzw. den Klassen 1 oder 2 entsprechend der Richtlinie 2009/41/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über die Anwendung genetisch veränderter Mikroorganismen in geschlossenen Systemen zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
-nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
Bitte nicht für wissenschaftliche Publikationen
 z.B. Beschreibung von Typstämmen) oder Patentzwecke verwenden!

III. AUFBEWAHRUNGSBEDINGUNGEN

Glycerinkultur bei -80°C
 Aktivkultur 4°C

IV. BEDINGUNGEN FÜR DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG

Kultivierung in LB mit 100 µg/ml Carbenicillin bei 37°C, pH 7

V. BESTANDTEILE DER MISCHKULTUR (wenn zutreffend)

Beschreibung der Bestandteile (max. zwei Komponenten):

Verfahren, die die Prüfung auf Lebensfähigkeit der Bestandteile ermöglichen:

VI. EIGENSCHAFTEN, DIE FÜR DIE GESUNDHEIT ODER DIE UMWELT GEFÄHRLICH SIND

Risikogruppe des Mikroorganismus gemäß TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460)¹

☒ Risikogruppe 1 ☐ Risikogruppe 2

bei gentechnisch veränderten Mikroorganismen: Sicherheitsstufe nach dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik:

☒ S1 ☐ S2

Der zu hinterlegende Mikroorganismus darf unter folgenden Laborsicherheitsmaßnahmen² gehandhabt werden:

☒ L1 ☐ L2

Der Mikroorganismus hat folgende Eigenschaften, die für die Gesundheit oder die Umwelt gefährlich sind oder sein können:

Bitte angeben:

☒ Dem Unterzeichneten sind derartige Eigenschaften nicht bekannt.

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an, die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem gesonderten Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
 -nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

ANGABEN ZUM GENTECHNISCH VERÄNDERTEN MIKROORGANISMUS			
1. ANGABEN ZUM EMPFÄNGERORGANISMUS			
Bezeichnung: E. coli BL21(DE3)			
Risikogruppe ¹ : ☒ RG1 ☐ RG2			
Sensitivitäten: Resistenzen: Auxotrophien:			
besondere Eigenschaften: B; F-; dcm; opmT; hsdSR-B-mB-1 gal, Lambda(DE) (z.B. Restriktions-/Modifikationssystem, generelle genetische Rekombination)			
2. ANGABEN ZUM SPENDERORGANISMUS			
Bezeichnung: Bacillus subtilis			
Risikogruppe ¹ : ☒ RG1 ☐ RG2 ☐ RG3			
Beschreibung des klonierten DNA-Fragments:			
Informationsgehalt: beta-Glukosidase			
Größe (in bp): 1353 bp			
☐ vollständiges Genom ☐ cDNA ☐ subgenomisch ☒ synthetisch ☐ subgenisch			
Gefahrenpotential der klonierten DNA: ☐ pathogen ☐ tumorigen			
☐ toxisch ☐ allergen			
☒ kein Gefahrenpotential			
3. ANGABEN ZUM VEKTOR			
Bezeichnung: pET-AT-BglA			
Abkömmling (Derivat) von: pET-11d			
Wirtsspezifität: E. coli			
Resistenzen: Ampicillin			
Größe des Plasmids (in bp): ohne Insert: 7070 bp mit Insert: 8423 bp			
Promotoren: T7lac Promotor			
weitere vorhandene Leserahmen: LacI			
Angaben zu Mobilisierbarkeit und eigenen Transfer-Systemen: Angaben zur eigenen Infektiosität: Möglichkeit des Transfers durch endogene Helferviren:			
4. ANGABEN ZUM GVO²			
besondere Eigenschaften: (z.B. Produktion von ...; Einsatz als ...-Vektor etc.) Einsatz als Ganzzellbiokatalysator			
Fremd-DNA: ☐ chromosomal integriert ☒ episomal			
Gefahrenpotential: ☐ pathogen ☐ tumorigen			
☐ toxisch ☐ allergen			
☒ kein Gefahrenpotential bitte begründen:			
KLASSIFIZIERUNG NACH GENTG: ☒ S1 ☐ S2			
<i>Die Hinterlegung eines gentechnisch veränderten Organismus der Sicherheitsstufe 2 kann gemäß dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik nur in Kraft treten, wenn der DSMZ eine Kopie der Ergebnisse der Sicherheitsüberprüfung durch die zuständige Behörde vom Hinterleger zugesandt wird.</i>			

¹ Die DSMZ nimmt zur Hinterlegung ausschließlich Mikroorganismen an die gemäß Biostoff-Verordnung den Risikogruppen 1 und 2 zuzuordnen sind (vgl. TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe): 'Einstufung von Bakterien in Risikogruppen' (TRBA 466) und 'Einstufung von Pilzen in Risikogruppen' (TRBA 460). Gentechnisch veränderte Organismen müssen den Sicherheitsstufen S1 oder S2 entsprechend dem Gesetz zur Regelung der der Gentechnik zugeordnet werden können.

² Ankreuzen, wenn auf einem besonderen Blatt weitere Angaben eingereicht werden.

NUR FÜR SICHERHEITSHINTERLEGUNGEN!
-nicht für Patentzwecke oder wissenschaftliche Publikationen-

$$\{ \}^5$$

IX. WEITERE ANGABEN?

 $\{ \}^E$

a) Die Kultur soll in den Bestand der öffentlichen Sammlung der DSMZ überführt werden ☐ ja ☐ nein

b) Die Kultur soll gegen Gebühr an den Hinterleger zurückgegeben werden ☐ ja ☐ nein

c) Die Kultur soll durch die DSMZ vernichtet werden ☐ ja ☐ nein

BECKER

Laak

Unterschrift(en):

schieden).  

E-Mail ganzteilkatalysator@patentfonds

Datum:

- Patenthinterlegung, Formblatt DSMZ-BP/1-Bakterien/Archaeen/Pilze (vierte und letzte Seite) 01/2012

Mail Adresse wird die
DSMZ / Patents
 document received

30. Okt. 2513

**BIOCATALIZADOR DE CELULA COMPLETA EN LA DEGRADACION DE
BIOMASA CELULOSICA**

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5 La invención se relaciona con una molécula de ácido nucleico que comprende los siguientes componentes: (1) una sección la cual codifica para un péptido señal, (2) una sección la cual codifica para una celulasa heteróloga, (3) una sección opcional la cual codifica para un sitio de
10 reconocimiento de proteasa, (4) una sección la cual codifica para un enlazante transmembranal, y (5) una sección la cual codifica para un dominio transportador de un autotransportador o de una variante del mismo.

 Los aspectos adicionales de la presente invención
15 se relacionan con polipéptidos los cuales son codificados por una molécula ácido nucleico como se describe en lo anterior, microorganismos los cuales presentan los polipéptidos correspondientes en su superficie y fracciones de membrana que se pueden obtener de estos microorganismos. La presente
20 invención también se relaciona con un método para la producción de productos de reacción, en particular de productos de reacción de celulosa utilizando microorganismos o fracciones de membrana y también el uso de microorganismos y/o preparaciones de membrana para producir productos a partir
25 de una reacción la cual es catalizada por una celulasa.

Las celulasas son enzimas las cuales pueden degradar celulosa en su unidad básica, beta-glucosa. Las celulasas se forman únicamente a partir de una parte pequeña de los organismos que degradan plantas tales como por ejemplo, bacterias especiales y flagelados y partir de microorganismos que degradan madera tales como hongos. Con la ayuda de estas enzimas los microorganismos correspondientes son capaces de dividir y reciclar metabólicamente celulosa, la cual normalmente también consiste de 3000 a 15,000 moléculas de glucosa, en productos de degradación y finalmente en glucosa. Las celulasas incluyen, en particular, tres tipos de enzimas cuyos efectos combinados permiten una digestión racional de las moléculas de celulosa:

1. Endocelulasas (clase de enzima, EC 3.2.1.4):
Estas enzimas dividen celulosa en secciones más grandes y, a diferencia de otras celulasas, también funcionan dentro de cadenas de celulosa. En particular, las endocelulasas se pueden volver activas en "regiones amorfas" en las cuales las moléculas de celulosa están desordenadas unas en relación con otras. Como un resultado de esto, las enzimas generan un número más grande de extremos de cadena.

2. Exocelulasas (EC 3.2.1.91): estas enzimas únicamente dividen celulosa de sus extremos mientras continuamente acortan las cadenas de celulosa. La reacción de las exocelulasas típicamente provocan unidades celobiosa (disacáridos),

pero también glucosa, celotriosa o celultetraosa para separar por división a partir de la cadena de celulosa.

3. Celobiosa o beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21): Este grupo de enzimas divide el enlace beta-glucosídico entre dos moléculas de glucosa de la celobiosa y de esta manera vuelve disponible la glucosa para procesos metabólicos adicionales.

Cada una de las tres enzimas mencionadas es capaz de atacar la biomasa celulósica por sí misma. No obstante, se supone que una combinación de los tipos de enzima se comporta sinérgicamente en un alto grado dado que atacan diferentes unidades estructurales naturales de la biomasa celulósica. En particular, cuando se utiliza celobioasa se puede esperar que la degradación de las celobiosas, celotriosas y otros celooligosacáridos superiores proporcionados por las endocelulasas y exocelulasas en glucosa genera un desplazamiento del equilibrio de las reacciones catalizadas enzimáticamente y de esta manera alienta una conversión más eficaz.

La celulosa y hemicelulosa son componentes principales de la madera y muchas plantas y de esta manera representan una materia prima disponible libremente. Un problema con la conversión del material, no obstante, se encuentra en la dificultad de separarlo, por ejemplo en glucosa, el cual representa un obstáculo para su uso extenso en la obtención de bioetanol. En el estado de la técnica, actualmente están presentes algunas enzimas purificadas que se utilizan para descomponer

celulosa en glucosa las cuales generalmente deben ser aisladas de cultivos micóticos tales como *Trichoderma reesei* o *C. acetobulyticum* (cf. Shah et al., App. Biochem. Biotech. (1991), vol. 18/29, 99 - 106). La purificación de las enzimas
5 individuales y el mezclado de una combinación de enzimas eficaz antes del uso en la descomposición de biomasa celulósica representa un factor de costo significativo en el estado de la técnica actual. También es imposible en el estado de la técnica recuperar las enzimas libres
10 correspondientes del producto obtenido. Por lo tanto, existe la necesidad de una forma de elaboración fácil de celulasas la cual, en primer lugar, permita una manufactura y procesos de mezclado simplificados y en segundo lugar permita que las enzimas sean recuperadas conforme son utilizadas, de una manera sencilla.

15 Un problema de la presente invención por lo tanto se encuentra en suministrar un agente con una actividad de celulasa, por lo que el agente no es accesible fácilmente para moléculas de sustrato pero también puede ser amplificada, reciclada y regenerada de una manera sencilla.
20 Esto habilitaría varias etapas de catalizador sin la necesidad de fabricar repetidamente agente nuevo. Un problema adicional de la presente invención se encuentra en proporcionar un agente que presente propiedades favorables respecto a su genética, termoestabilidad, susceptibilidad a
25 almacenamiento y estabilidad.

Los inventores han descubierto, sorprendentemente, que mediante el uso de un sistema autotransportador, las celulasas se pueden expresar en la superficie de microorganismos y son suficientemente estables con respecto a las condiciones de reacción para la división de celulosa y la separación posterior de los productos obtenidos. Sorprendentemente también se ha encontrado que los microorganismos los cuales transportan las celulasas correspondientes en su superficie pueden ser incubadas y permanecer estables en diversas soluciones y amortiguadores bajo condiciones variables durante un período prolongado.

La autopresentación representa una herramienta elegante para presentar proteínas recombinantes sobre la superficie de las bacterias. Este sistema de expresión se basa en el mecanismo de secreción de la familia de proteínas de los autotransportadores, los cuales pertenecen al sistema de secreción tipo V.

En bacterias gramnegativas, la vía autotransportadora se conforma tanto del transporte de proteínas a la superficie celular así como la secreción de proteínas en el espacio extracelular (Jose y Meyer, 2007). Las proteínas autotransportadoras son sintetizadas como proteínas precursoras, las cuales satisfacen todos los requerimientos estructurales para el transporte a la superficie celular (Jose, 2006). Son sintetizadas con un

péptido señal N-terminal, el cual es típico para la vía Sec, la cual habilita el cruce de la membrana interna. Una vez en el periplasma, la parte C-terminal del precursor, después de dividir el péptido señal, se pliega a sí misma en la membrana exterior como una estructura similar a poro conocida como un beta-barril. El dominio pasajero unido N-terminal es trasladado a través de este poro a la superficie (Jose et al., 2002). Aquí se puede separar por división -ya sea autoproteolíticamente o por una proteasa adicional- o permanecer anclado a la envoltura de la célula por medio del dominio transportador.

La sustitución del pasajero natural por una proteína recombinante genera la translocación a la superficie de la misma. Para hacer esto, se deben utilizar procesos de ingeniería genética para construir un precursor artificial que consiste de un péptido señal, el pasajero recombinante, el beta-barril y una región enlazante entre las mismas, la cual es necesaria para acceso irrestricto a la superficie. El autotransportador AIDA-I ya se ha utilizado con éxito de esta manera para una presentación eficiente en superficie de diversos dominios pasajeros (Henderson et al., 2004). En el sistema de autopresentación, se ha observado una autoasociación de subunidades sobre una enzima activa, por ejemplo, en la enzima dimérica sorbitol-deshidrogenasa (Jose, 2002; Jose and von Schwichow, 2004).

En particular, la tecnología de autopresentación es un método de expresión para proteínas específicas en la superficie de la membrana exterior de *E. coli* y otras bacterias gramnegativas con un sistema de autopresentación que se basa en el mecanismo de secreción natural de las proteínas autotransportadoras (A. Banerjee et al. (2002)). En este caso, el transporte de la proteína pasajera recombinante se puede llevar a cabo simplemente al insertar su secuencia codificante en el marco de lectura, o su secuencia codificante entre el péptido señal y el dominio de translocación del vector de autopresentación utilizando técnicas de ingeniería genética comunes. El péptido señal se puede obtener de una subunidad de la toxina del cólera y se puede combinar con un promotor artificial. En consecuencia, la proteína pasajera destinada para translocación a través de la membrana exterior se expresa como proteína de fusión recombinante con otra proteína, conocida como un autotransportador, sobre la membrana exterior de *E. coli* (AIDA-I) (Jose, 2006). La porción C-terminal de la proteína autotransportadora forma una estructura similar a poro (β -barril) dentro de la membrana exterior de la membrana de *E. coli* (Jose, 1995, 2006, 2007).

El concepto del sistema de autopresentación, descrito por primera vez por Jose et al. (1995), se ha conocido durante más de 15 años. Mientras tanto, se ha

demostrado que se puede utilizar para producir células con nitrilasas inmovilizadas en el mismo (véase WO 2011/057820) y enzimas activas redox las que a su vez generan factores redox, en particular NAD/NADH y NADP/NADPH (véase WO 2012/025628), los cuales muestran la actividad deseada. No obstante, la transferencia del sistema de autopresentación a una clase de enzima nueva aún representa retos considerables para las personas expertas en el ámbito, especialmente puesto que no se garantiza una naturalización correcta de las proteínas, en ausencia de los chaperones, los cuales algunas veces son necesarios. Hasta ahora, el estado de la técnica no ha descrito ni sugerido el uso del sistema autotransportador para la inmovilización de celulasas.

El problema de la presente invención se resuelve por la materia objeto de las reivindicaciones independientes. Se pueden derivar modalidades preferidas a partir de las reivindicaciones dependientes.

El problema de la presente invención se resuelve de acuerdo con un primer aspecto por una molécula de ácido nucleico que comprende:

- (1) una sección que codifica para un péptido señal,
- (2) una sección que codifica para una celulasas eteróloga o una variante de la misma,
- (3) una sección opcional que codifica para un sitio de reconocimiento de proteasa,

(4) una sección que codifica para un enlazante transmembranal, y

(5) una sección que codifica para un dominio transportador de un autotransportador o una variante del mismo.

Los aspectos adicionales de la presente invención se relacionan con proteínas y polipéptidos, obtenibles por transcripción de las moléculas de ácido nucleico correspondientes y microorganismos que contienen las proteínas correspondientes y preparaciones de membrana asequibles a partir de estos microorganismos. Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un método para producir un producto de reacción utilizando por lo menos una celulasa, que comprende las siguientes etapas:

(i) preparación de por lo menos un microorganismo, el cual presenta una célula en su superficie y/o una preparación de membrana de este microorganismo, y

(ii) poner en contacto por lo menos un microorganismo y/o una preparación de membrana con uno o más sustratos de celulasa bajo condiciones compatibles con la actividad de celulasa.

Finalmente, la presente invención también se relaciona con el uso de microorganismos o preparaciones de membrana descritas para fabricar productos de reacción los cuales se pueden producir a partir de catálisis de celulasa y

también métodos para la producción de microorganismos y preparaciones de membrana correspondientes.

En una modalidad preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico se enlaza
5 funcionalmente con una secuencia para regulación de expresión. En una modalidad preferida, el término "secuencia para regulación de expresión", como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de ácido nucleico la cual puede regular el nivel de expresión de una molécula de
10 ácido nucleico, preferiblemente corriente abajo de la secuencia para regulación de expresión. La secuencia para regulación de expresión puede ser, por ejemplo, un promotor. Las personas expertas en el ámbito están familiarizadas con secuencias adecuadas para regulación de expresión y métodos
15 para el enlace funcional de estas secuencias con una molécula de ácido nucleico. En relación con la presente invención, las secuencias de regulación de expresión se prefieren especialmente las cuales codifican para reguladores de expresión los cuales pueden ser activados con la ayuda de los inductores isopropiltioglucopiranósido
20 (IPTG) o arabinosa, en particular L-arabinosa.

En una modalidad preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es parte de un plásmido recombinante.

En una modalidad preferida de la presente
25 invención, el término "heterólogo", como se utiliza en la

presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico la cual se ha construido utilizando métodos de ingeniería genética, por ejemplo, mediante empalme de una secuencia para regulación de expresión y una secuencia que se va a expresar, 5 la cual normalmente no se encuentra bajo el control de esta secuencia para regulación de expresión o mediante el uso de una secuencia la cual tiene una mutación puntual a partir de la secuencia original. De esta manera, incluso si solo una sección de una construcción se describe como heteróloga, por 10 lo tanto implica que la construcción completa es heteróloga. Las personas expertas en el ámbito están familiarizadas con los métodos de ingeniería genética. En una modalidad preferida adicional, el término "heterólogo" como se utiliza en la presente se refiere a una molécula de ácido nucleico 15 que codifica para un polipéptido la cual está empalmada a una secuencia para regulación de expresión y/o una secuencia fusionada, la cual se deriva de un organismo diferente de la secuencia para regulación de expresión que se va a expresar. En una modalidad preferida adicional, el término 20 "heterólogo", como se utiliza en la presente en relación con un polipéptido de celulasa significa que la sección de la molécula de ácido nucleico la cual codifica para la celulasa, se ha obtenido o se ha tomado de un organismo diferente que por lo menos una sección adicional, de manera que el dominio 25 a transportador o la secuencia para regulación de expresión o

el enlazante transmembranal. Por ejemplo, la celulasa es heteróloga si se ha obtenido de *Bacillus subtilis*, pero todas las demás secuencias se han obtenido de *E. coli*. En una modalidad preferida adicional, el término "heterólogo", como
5 se utiliza en la presente, significa que la secuencia de ácido nucleico descrita como heteróloga se ha derivado de un organismo el cual es diferente del hospedador u hospedador destinado o utilizado para expresar o amplificar esta secuencia de ácido nucleico.

10 En una modalidad preferida especialmente, la molécula de ácido nucleico comprende las secuencias SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3 o SEC ID NO: 5 o variantes de las mismas.

En una modalidad de la presente invención, el término "péptido señal", como se utiliza en la presente, se
15 refiere a una secuencia de aminoácidos, preferiblemente en la parte N-terminal de un polipéptido, con el efecto de que el polipéptido, cuando se expresa en el citosol de una célula hospedadora, es sometido a translocación a un compartimiento específico de la célula, preferiblemente un compartimiento
20 diferente del citosol. En una modalidad preferida especialmente, la célula hospedadora es una bacteria gramnegativa y el péptido señal provoca que el polipéptido naciente o completado sea sometido a translocación en el periplasma de la membrana exterior de la célula de la
25 bacteria gramnegativa.

En una modalidad preferida adicional de la presente invención, el término "sitio de reconocimiento de proteasa", como se utiliza en la presente, se refiere a un patrón de secuencia de aminoácidos específico en un polipéptido, en donde este patrón de secuencia se reconoce específicamente por la proteasa de manera que se une y escinde al polipéptido.

Dentro del alcance de la presente invención, también se prefiere si el término "enlazante transmembranal", como se utiliza en la presente, se refiere a una sección de polipéptido flexible la cual se utiliza para enlazar el dominio autotransportador con el polipéptido regenerador de factor redox, pero es suficientemente flexible para habilitar una naturalización independiente y/o transporte del polipéptido de regeneración de factor redox.

En una modalidad preferida de la presente invención, el término "dominio transportador de un autotransportador" se refiere a un dominio el cual puede ser utilizado para obtener el producto de expresión de una molécula de ácido nucleico, si se sintetiza ribosómicamente dentro de la célula, preferiblemente en el citoplasma bacteriano y es sometido a translocación a la membrana exterior de la célula, preferiblemente al lado de la membrana exterior que está expuesto al ambiente extracelular. En una modalidad especialmente preferida, el dominio transportador tiene el efecto de que el producto de expresión se localiza

sobre la superficie externa de la membrana exterior. En una modalidad preferida de la presente invención, el dominio transportador de un autotransportador es una proteína que se localiza sobre la membrana exterior de la célula y la sección
5 que codifica para una celulasa es parte de un dominio, bucle o alguna otra parte del dominio transportador o se fusiona al mismo de manera que la celulasa se presenta sobre la superficie de la célula. En una modalidad preferida adicional de la presente invención, el dominio transportador de un autotransportador es una proteína de un
10 sistema el cual puede ser utilizado para presentar polipéptidos sobre la superficie de una célula.

En una modalidad preferida, las variantes de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico a las que se hace referencia en la presente solicitud de manera explícita, por
15 ejemplo por el nombre o el número de deposición o incluso por el término "variante de" o, de manera implícita, por ejemplo por una descripción de su función en el contexto de la presente invención. En una modalidad preferida, el término "variante" como se utiliza en la presente comprende un
20 aminoácido o secuencias de ácido nucleico que son 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% idénticas al aminoácido que sirve como referencia y, bajo condiciones comparables, muestra actividad de celulasa similar. En una modalidad preferida, el término "variante" comprende, con
25 respecto a una secuencia de aminoácidos, aquellas secuencias

de aminoácidos que tienen uno o más cambios de aminoácidos conservadores en relación a la secuencia de referencia. En una modalidad preferida, los términos "variantes" de una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico
5 comprenden secciones activas y/o fragmentos de la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico. En una modalidad preferida, el término "sección activa", como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico que es más
10 corta que la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de longitud completa pero que aún retiene por lo menos parte de su actividad biológica esencial, por ejemplo, como una celulasa. En una modalidad preferida, el término "variante" de un ácido nucleico comprende los ácidos nucleicos de la
15 cadena complementaria los cuales - preferiblemente bajo condiciones rigurosas - hibridizan con el ácido nucleico de referencia. La rigurosidad de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por una persona experta en el ámbito y habitualmente es un cálculo empírico, como una
20 función de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para una asociación perfecta mientras que sondas más cortas requieren temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad
25 del ADN desnaturalizado para renaturalización, cuando las

cadenas complementarias están en un ambiente que tiene una temperatura por debajo del punto de fusión de las cadenas. Cuanto mayor es el grado de homología deseado entre la sonda y una secuencia hibridizable mayor es la temperatura relativa que se puede aplicar. Por lo tanto, se deduce que temperaturas relativas superiores tienden a volver las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas reducen esta rigurosidad. Los detalles adicionales de una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación se puede encontrar en Ausubel et al. (1995). En otra modalidad preferida el término "variante" de un ácido nucleico o aminoácido se refiere a un ácido nucleico o aminoácido que tiene, por lo menos hasta cierto grado, la misma actividad biológica y/o función que el ácido nucleico o aminoácido de referencia. En una modalidad preferida, el término "variante" de una secuencia de ácido nucleico, como se utiliza en la presente, se refiere a otra secuencia de ácido nucleico la cual codifica para una secuencia de aminoácidos que es similar a la secuencia de aminoácidos de referencia.

En una modalidad preferida, el término "celulasa" se refiere a una enzima de la clase EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.91 o EC 3.2.1.21. En una modalidad preferida adicional la celulasa es una celulasa de *Bacillus subtilis* o *Clostridium thermocellum*. La celulasa puede ser una endo-, exo- o

exocelulasa o una beta-glucosidasa. Dentro del alcance de la presente invención, no obstante, es preferible si es una endocelulasa de *Bacillus subtilis*, una exocelulasa de *Clostridium thermocellum* o una beta-glucosidasa de *Clostridium thermocellum*. Es especialmente preferible si es una enzima con una secuencia de acuerdo con la SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 6 o una variante de la misma.

Preferiblemente, la celulasa se fusiona con un dominio transportador de un autotransportador.

El dominio transportador del autotransportador de acuerdo con la invención puede ser cualquier dominio transportador de un autotransportador y preferiblemente es capaz de formar una estructura de β -barril. Una descripción extensa de las estructuras de β -barril y los ejemplos preferidos para autotransportadores de β -barril se describen en WO 97/35022 y forman parte de la presente descripción como referencia. Henderson et al. (2004) describe proteínas autotransportadoras con dominios autotransportadores adecuados (un resumen se puede encontrar en la Tabla 1 en Henderson et al., 2004). La descripción de Henderson et al. (2004) forma parte de la presente descripción como referencia. Por ejemplo, el dominio transportador del autotransportador se puede seleccionar de: Ssp (P09489, *S. marcescens*), Ssp-h1 (BAA33455, *S. marcescens*), Ssp-H₂ (BAA11383, *S. marcescens*), PspA (BAA36466, *P. fluorescens*),

PspB (BAA36467, *P. fluorescens*), Ssa1 (AAA80490. *P. haemolytica*), SphB1 (CAC44081, *B. pertussis*), AspA/NalP (AAN71715, *N. meningitidis*), VacA (Q48247, *H. pylori*), AIDA-I (Q03155, *E. coli*), IcsA (AAA26547, *S. flexneri*), MisL (AAD16954, *S. enterica*), TibA (AAD41751, *E. coli*), Ag43 (P39180. *E. coli*), ShdA (AAD25110. *S. enterica*), AutA (CAB89117, *N. meningitidis*), Tsh (I54632, *E. coli*), SepA (CAC05786, *S. flexneri*), EspC (AAC44731, *E. coli*), EspP (CAA66144, *E. coli*), Pet (AAC26634, *E. coli*), Pic (AAD23953, *E. coli*), SigA (AAF67320, *S. flexneri*), Sat (AAG30168, *E. coli*), Vat (AAO21903, *E. coli*), EpeA (AAL18821, *E. coli*), EatA (AAO17297, *E. coli*), EspI (CAC39286, *E. coli*), EaaA (AAF63237, *E. coli*), EaaC (AAF63038, *E. coli*), Pertactina (P14283, *B. pertussis*), BrkA (AAA51646, *B. pertussis*), Tef (AAQ82668, *B. Pertussis*), Vag8 (AAC31247, *B. pertussis*), PmpD (O84818, *C. trachomatis*), Pmp20 (Q9Z812, *C. pneumoniae*), Pmp21 (Q9Z6U5, *C. pneumoniae*), proteasa IgA1 (NP_283693, *N. meningitidis*), App (CAC14670. *N. meningitidis*), proteasa IgA1 (P45386, *H. influenzae*), Hap (P45387, *H. influenzae*), rOmpA (P15921, *R. rickettsii*), rOmpB (Q53047, *R. rickettsii*), ApeE (AAC38796, *S. enterica*), EstA (AAB61674, *P. aeruginosa*), Lip-1 (P40601, *X. luminiscens*), McaP (AAP97134, *M. catarrhalis*), BabA (AAC38081, *H. pylori*), SabA (AAD06240. *H. pylori*), AlpA (CAB05386, *H. pylori*), Aae (AAP21063, *A. actinomycetem-comitans*), NanB (AAG35309, *P. haemolytica*) y variantes de estos autotransportadores. Para cada uno de los ejemplos de proteínas autotransportadoras,

los ejemplos, de los números de acceso y especies adecuados de GenBank, para los cuales se pueden obtener autotransportadores se proporcionan entre paréntesis. Dentro del ámbito de la presente invención, el dominio transportador en el autotransportador preferiblemente se selecciona del grupo que comprende Ssp, Ssp-h1, Ssp-h2, PspA, PspB, Ssa1, SphB1, AspA/NalP, VacA, AIDA-I, IcsA, MisL, TibA, Ag43, ShdA, AutA, Tsh, SepA, EspC, EspP, Pet, Pic, SigA, Sat, Vat, EpeA, EatA, EspI, EaaA, EaaC, Pertactina, BrkA, Tef, Vag8, PmpD, Pmp20, Pmp21, proteasa AgA1, App, Hap, rOmpA, rOmpB, ApeE, EstA, Lip-1, McaP, BabA, SabA, AlpA, Aae, NanB y variantes de los mismos. En una modalidad preferida especialmente, el dominio transportador es un dominio transportador del sistema de autopresentación, también denominado como una vía autotransportadora del tipo AIDA-I de células bacterias gramnegativas, en particular de *E. coli* o una variante del mismo, por ejemplo, los descritos por Niewert et al. (2001).

Las variantes de las secuencias autotransportadoras mencionadas en lo anterior se pueden obtener, por ejemplo, al alterar la secuencia de aminoácidos en las estructuras de bucle del β -barril que no pertenezcan a las secciones transmembranales. Opcionalmente, los ácidos nucleicos que codifican para los bucles de superficie se pueden suprimir por completo. Además, se pueden realizar intercambios de aminoácidos conservadores dentro de las estructuras de lámina

plegada β anfipáticas, es decir, intercambio de un aminoácido hidrofílico por otro aminoácido hidrofílico y/o intercambio de un aminoácido hidrofóbico por otro aminoácido hidrofóbico. Preferiblemente, a nivel de aminoácidos una variante tiene
5 una identidad de secuencia de por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 98% con la secuencia correspondiente que se encuentre de modo natural del dominio autotransportador, especialmente en la región de estructuras de láminas plegadas β .

10 Como se describe en lo anterior, el problema de la presente invención se resuelve, en un aspecto, por un microorganismo el cual expresa un polipéptido en su superficie, como se describe en lo anterior o que ha sido transformado utilizando una molécula de ácido nucleico como
15 se describe en lo anterior.

En una modalidad preferida, el término "microorganismo", el cual se utiliza de manera intercambiable con el término "célula hospedadora", como se utiliza en la presente, se refiere a un microorganismo el cual es capaz de
20 expresar un polipéptido. Este microorganismo también se puede denominar como un "catalizador de célula completa" o "biocatalizador de célula completa". En otra modalidad preferida, la célula o célula hospedadora es una célula procariótica, preferiblemente una célula bacteriana
25 gramnegativa, de manera muy especial preferiblemente una

célula de *E. coli*. En otra modalidad preferida, la célula es una célula eucariótica. En otra modalidad preferida la célula o célula hospedadora es una espora de una procariota.

Una célula bacteriana comprende un número de
5 compartimientos los cuales están separados entre sí por membranas hidrofóbicas. Una célula bacteriana grampositiva tiene una membrana plasmática la cual delimita el citosol, el interior de la célula. La membrana plasmática está rodeada por una capa de péptidoglucano. En contraste, la bacteria
10 gramnegativa posee, además de la membrana plasmática, otra membrana conocida como la membrana exterior. El término "superficie", como se utiliza en la presente, prefriblemente se refiere a una capa del microorganismo que está expuesto al ambiente, en donde el ambiente es, por ejemplo, el medio de
15 cultivo líquido utilizado como un cultivo para la célula de interés. En una modalidad preferida muy especialmente, un polipéptido de acuerdo con la presente invención se expresa en el exterior de la membrana exterior y una célula bacteriana gramnegativa. En una modalidad preferida, un
20 polipéptido de acuerdo con la presente invención se expresa en el interior de la membrana exterior de una célula bacteriana gramnegativa. En otra modalidad preferida, el polipéptido de acuerdo con la invención se expresa en el exterior de un esferoplasto, el cual es una célula bacteriana
25 gramnegativa a partir de la cual se ha separado la membrana

exterior. La persona experta en el ámbito estará familiarizada con métodos que se pueden utilizar para producir esferoplastos. En otra modalidad preferida, el polipéptido de acuerdo con la invención se expresa en el exterior de una
5 célula bacteriana grampositiva. De esta manera, como se utilizan en la presente, los términos "presentado en la superficie" y "expresado en la superficie" son sinónimos.

De acuerdo con un aspecto adicional, el problema de la presente invención se resuelve por una fracción de
10 membrana la cual se puede obtener a partir de la célula de acuerdo con el aspecto previo de la presente invención.

En una modalidad preferida de la presente invención, la fracción de membrana o la preparación de membrana, los dos términos se utilizan de manera
15 intercambiable, comprende una celulosa de acuerdo con el primer aspecto de la invención, preferiblemente en un estado catalíticamente activo. Los términos "fracción de membrana" y "preparación de membrana", como se utilizan en la presente, de manera preferible se refieren a un producto que está
20 enriquecido en constituyentes de membrana, preferiblemente constituyentes de la membrana exterior de una bacteria gramnegativa. Una persona experta en el ámbito está familiarizada con protocolos y métodos que se pueden utilizar para producir preparaciones de membrana. Por ejemplo, las
25 células bacterianas se pueden recolectar a partir de un

cultivo y se pueden enviar a lisis, por ejemplo, por ciclos de congelamiento y recalentamiento, irradiación acústica, suspensión en amortiguador de lisis o similar, seguido por centrifugación diferencial, con el fin de aislar fracciones

5 de membrana de las células. En una modalidad preferida de la presente invención, la preparación de membrana es una preparación de la membrana exterior, es decir, una preparación en la cual existe enriquecimiento de los

10 constituyentes de la membrana exterior en relación a los constituyentes de otras membranas y compartimientos, tales como el citosol, la membrana interior y el periplasma. Las personas expertas en el ámbito están familiarizadas con protocolos y métodos que se pueden utilizar para aislar o enriquecer la membrana exterior o constituyentes de la misma,

15 por ejemplo un tratamiento de lisozima de células bacterianas, seguido por etapas de centrifugación. En una modalidad preferida, la fracción de membrana puede ser tratada como una fracción de membrana, es decir, el contenido o las propiedades de la fracción de membrana se han

20 modificado, por ejemplo al purificar un constituyentes proteínico de la fracción de membrana o al solubilizar las fracciones de membrana y/o al tomar constituyentes de la fracción de membrana en vesículas. En una modalidad preferida de la presente invención, la fracción de membrana se puede inmovilizar - por ejemplo en la superficie

25 de un vaso o una columna.

De acuerdo con un aspecto adicional, el problema de la presente invención se resuelve por un método para producir un producto de reacción utilizando o por lo menos una celulasa, que comprende las siguientes etapas:

5 (i) preparación de por lo menos un microorganismo el cual presenta una celulasa en su superficie, y/o una preparación de membrana de este microorganismo, y (ii) poner en contacto por lo menos un microorganismo y/o preparación de membrana con uno o más sustratos de celulasa bajo condiciones
10 compatibles con actividad de celulasa. La expresión "presentada" se debe entender, en relación con la presente invención, que significa que la celulasa se proyecta al medio circundante del microorganismo o los microorganismos.

El método de acuerdo con la invención puede ser
15 aplicado ventajosamente de manera especial si el producto de la reacción catalizada por la celulasa es un mono-, di- u oligosacárido y si por lo menos un sustrato de celulasa es una fuente de polisacárido, especialmente de manera preferible una fuente de celulosa. Los términos "fuente de polisacárido" y "fuente de
20 celulosa" debe entenderse que significa que los materiales que contienen polisacáridos o celulosa, preferiblemente como componente principal, no necesariamente consisten únicamente de los mismos. Si la fuente de celulosa es celulosa, dependiendo de la celulasa utilizada, se pueden obtener los productos resultantes de glucosa,
25 celulosa y oligosacáridos basados en glucosa.

Además, el método de acuerdo con la invención ventajosamente se puede aplicar adicionalmente si se incluye una etapa (iii) de recuperación del microorganismo utilizado en la etapa (ii). La recuperación se puede realizar, por
5 ejemplo, por separación mediante centrifugación de las células de la mezcla de reacción.

Dentro del alcance de la presente invención ha surgido que la etapa (ii) preferiblemente se puede llevar a cabo en un intervalo de pH de 4.5 a 6.5, de manera
10 especialmente preferible en un intervalo de 5.5 a 6.5. Las celulasas presentan su actividad más alta para los valores de pH correspondientes. Además, también se ha demostrado útil seleccionar la temperatura durante la etapa (ii) en el intervalo de 30 a 80°C, preferiblemente en el
15 intervalo de 50 a 65°C, puesto que las celulasas presentan el nivel más alto de actividad en este intervalo de temperatura.

En los métodos descritos en lo anterior, si se han utilizado celulasas las cuales no producen glucosa como producto final, puede ser útil convertir los productos
20 producidos a glucosa puesto que en presencia de volúmenes más grandes de celobiosa, la actividad de las enzimas se puede deteriorar. Dentro del alcance de la presente invención, la adición de glucosidasas en la etapa (ii) del método descrito en lo anterior por lo tanto es lo que se prefiere. Estas
25 glucosidasas ventajosamente no son enzimas unidas a

microorganismos, de manera especialmente preferible estas son beta-glucosidasa de almendras.

Cualquiera de los polisacáridos se puede utilizar como una fuente de polisacáridos los cuales son el producto de descomposición de celulasa. Dentro del alcance de la presente invención, no obstante, se ha vuelto evidente que es especialmente ventajoso si una fuente de celulosa se utiliza como una fuente de polisacáridos. La fuente de celulosa puede ser ya sea celulosa purificada con solo porciones pequeñas de sustancias extrañas (preferiblemente en el intervalo de menos de 80% en peso, en particular en el intervalo de menos de 90% en peso). En particular, puede ser agua de desperdicio comunal, la cual se puede utilizar directamente o a partir de la cual se puede recuperar celulosa utilizando métodos conocidos y después se puede convertir con uno o varios microorganismos. De igual manera, el agua de desperdicio que contiene celulosa de trabajos de pulpa de madera o molinos de papel se puede utilizar como la fuente de celulosa. No obstante, también es posible utilizar una fuente de celulosa la cual contenga contaminantes tales como, por ejemplo, madera la cual pueda haber sido pretratada. La madera ventajosamente puede ser madera que se selecciona de pino, alerce, picea, haya, eucalipto, abeto, álamo, pino, haya, roble, fresno, castaño, abedul, cerezo, arce o nogal. Una madera preferida dentro del alcance de la

invención es madera de álamo. De manera alternativa, no obstante, los restos de plantas anuales que contengan celulosa, por ejemplo, paja se pueden utilizar en el método de acuerdo con la invención como una fuente de polisacáridos.

- 5 La madera o restos de planta correspondientes pueden ser pretratados, por ejemplo, para eliminar cualquier hemicelulosa que puedan contener. No obstante, la fuente de polisacáridos puede contener cantidades significativas de lignina, también es posible utilizar madera o residuos de
10 planta los cuales contengan hemicelulosa.

En el método de acuerdo con la invención, un tipo de microorganismos los cuales presentan una clase específica de celulasas en su superficie se puede utilizar, pero también es posible utilizar una mezcla de microorganismos la cual
15 presenta diversas clases de celulasas en su superficie. Es preferible si se utiliza, en el método, por lo menos una mezcla de por lo menos una endo- y por lo menos una exocelulasa, de manera especialmente preferible una mezcla de por lo menos una endo- y por lo menos una exocelulasa y por
20 lo menos una beta-glucosidasa. En una modalidad preferida especialmente, la relación de microorganismos modificados en endo- respecto a exocelulasa es 25:75 a 75:25 y de manera más especial preferiblemente 25:75 a 40:60, la mezcla está libre de microorganismos modificados por beta-glucosidasa. En otra
25 modalidad preferida, el método utiliza una mezcla de endo- y

exocelulasa y microorganismos modificados en beta-glucosidasa, la cual de manera preferible especialmente está presente en una relación de aproximadamente 1:2:1. La endocelulasa preferiblemente incluye una secuencia peptídica
5 SEC ID NO: 2. La exocelulasa, independientemente de esto, preferiblemente incluye una secuencia peptídica SEC ID NO: 4. La beta-glucosidasa, independientemente de esto, preferiblemente incluye una secuencia peptídica de la SEC ID NO: 6.

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona
10 con el uso de microorganismos, como se describe en lo anterior o fracciones de membrana, como también se describe en lo anterior, para elaborar un producto de una reacción la cual es catalizada por una celulasa. En una modalidad preferida especialmente, el producto es un producto de degradación de
15 celulosa, en particular glucosa y/o celobiosa.

En otra modalidad preferida, el problema de la presente invención se resuelve por un método para producir un microorganismo el cual presenta una celulasa en su superficie, y que comprende las etapas de:

20 (a) insertar una molécula de ácido nucleico como se describe en lo anterior que contiene una secuencia de control de expresión unida operativamente a la molécula de ácido nucleico, en un microorganismo, y opcionalmente

(b) poner en contacto al microorganismo con una
25 sustancia que activa la secuencia de control de expresión.

Igualmente, el problema de la presente invención se resuelve por un método para producir una preparación de membrana la cual incluye, además de las etapas (a) y (b) descritas en lo anterior, una etapa subsecuente de obtención
5 de la preparación de membrana partir del microorganismo. Las medidas necesarias para esta etapa son las mismas que las descritas previamente.

En otra modalidad preferida, el problema de la presente invención se resuelve por una composición la cual
10 contiene uno o más de los microorganismos descritos en lo anterior los cuales presentan celulasas en su superficie y/o una preparación de membrana correspondiente.

La presente invención también se ilustra por las siguientes figuras, los ejemplos, los cuales no deben
15 considerarse como limitantes, los rasgos adicionales, modalidades y puntos principales y ventajas de los cuales se pueden derivar de la invención.

La figura 1 muestra una estructura esquemática de un caseté de autopresentación. El péptido señal (SP, por sus
20 siglas en inglés) sirve como transporte a través de la membrana interior. El β -barril se pliega a sí mismo en la membrana exterior y se ancla a la construcción en ese lugar. El enlazante es necesario para garantizar translocación completa del pasajero, en este caso, CipA, sobre la
25 superficie de la célula.

La figura 2 muestra una tarjeta de restricción del plásmido para expresión de Cel5A en el sistema T7 inducible (izquierda) y en el sistema constitutivo (derecha). El plásmido a la izquierda es un derivado de pET-11d (Novagen) y ha sido transformado en *E. coli* cepa BL21 (DE3),
5 el plásmido de la derecha es un derivado de pJM007 (Maurer et al., 1997) y ha sido transformado en *E. coli* BL21.

La figura 3 es una tarjeta de restricción del plásmido para la expresión de la proteína de fusión CelK en el sistema de pBAD inducible (izquierda) y en el sistema
10 constitutivo (derecha). El plásmido a la izquierda es un derivado (pBAD/gIII A (Invitrogen) y se ha transformado en *E. coli* BL21, mientras el plásmido de la derecha es un derivado pJM007 (Maurer et al., 1997) y ha sido transformado
15 en *E. coli* BL21.

La figura 4 es una tarjeta de restricción del plásmido para la expresión de la proteína de fusión BglA en el sistema T7 inducible (izquierda) y el sistema constitutivo (derecha). El plásmido a la izquierda es un derivado de
20 pET-11d (Novagen) y ha sido transformado en *E. coli* cepa BL21(DE3), mientras que el plásmido de la derecha es un derivado de pJM007 (Maurer et al., 1997) y ha sido transformado en *E. coli* BL21.

La figura 5 es una comparación de la expresión de la proteína de fusión Cel5A y la proteína de fusión de un
25

control sin sentido (NC, por sus siglas en inglés) en la superficie de *E. coli* BL21(DE3). Las proteínas de la membrana exterior se han aislado por medio de fraccionamiento de célula diferencial, se han separado utilizando SDS-PAGE
5 (acrilamida 10%) y se han teñido con azul brillante de Coomassie. M: estándar de tamaño de proteína, -/+ IPTG: no inducida o inducida; WT: cepa hospedadora.

La figura 6 es una prueba de la presentación de superficie de la proteína de fusión Cel5A en *E. coli*
10 BL21(DE3). Las proteínas de la membrana exterior se han aislado por medio de fraccionamiento de célula diferencial, se han separado SDS-PAGE (acrilamida 10%) y se han teñido utilizando azul brillante de Coomassie. M: estándar de tamaño de proteína; WT: cepa hospedadora, PK: proteinasa K.
15 La digestión de células completas con PK se llevó a cabo antes del aislamiento de la proteína de membrana exterior.

La figura 7 es un espectro de p-nitrofenolato bajo condiciones de CelK. Se determina fotométricamente p-nitrofenol 5 mM en amortiguador de Na-citrato (pH 6)
20 después de 10 minutos de incubación a 60°C y alcalinización subsecuente.

La figura 8 es la actividad de CelK inducible (pBAD) versus constitutiva (pJM). Las células se incuban con p-nitrofenol-celobiósido durante 3 min a 60°C y pH 6. Después
25 de la incubación se lleva a cabo la alcalinización utilizando

carbonato de sodio. El p-nitrofenolato resultante se detecta a 400 nm. Blanco: amortiguador + sustrato (sin células). WT: cepa hospedadora (sin plásmido).

La figura 9 es un control sin sentido (NC) para la actividad de CelK. Las células se mezclan con p-nitrofenolcelobiósido y se incuban a 60°C y pH 6. El p-nitrofenolato que se forma se detecta a 400 nm después de 1, 2, 3 y 4 min. La alcalinización se llevó a cabo de antemano utilizando carbonato de sodio. WT: cepa hospedadora. La figura muestra $MW \pm SD$; $n = 2$.

La figura 10 es una comparación de la expresión de la proteína de fusión CelK y de la proteína de fusión de un control sin sentido (NC) en *E. coli* BL21. Las proteínas de la membrana exterior se aíslan utilizando fraccionamiento celular diferencial, se separan utilizando SDS-PAGE (acrilamida 10%) y se tiñen utilizando azul brillante de Coomassie. M: estándar de tamaño de proteína; WT: cepa hospedadora.

La figura 11 muestra la estabilidad al almacenamiento de la cepa CelK. Las células se almacenan durante 8 días a 4°C y la actividad de CelK se determina a 60°C y pH por medio de un incremento en el p-nitrofenolato producido a 400 nm. WT: cepa hospedadora; NC: control sin sentido. La figura muestra $MW \pm SD$; $n = 3$.

La figura 12 es una prueba de la presentación de superficie de la proteína de fusión CelK en *E. coli* BL21. Las proteínas de la membrana exterior se han aislado utilizando

96
fraccionamiento de célula diferencial, se han separado utilizando SDS-PAGE (acrilamida 10%) y se han teñido utilizando azul brillante de Coomassie. M: Estándar de tamaño de proteína; WT: cepa hospedadora; PK: proteinasa K.

5 La digestión de células completas con PK se llevó a cabo antes del aislamiento de la proteína de membrana exterior.

La figura 13 es la expresión de la proteína de fusión BglA en el sistema pET inducible y el sistema pJM constitutivo en la superficie de *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* 10 BL21. Las proteínas de membrana exterior se aislaron utilizando fraccionamiento de célula diferencial, se separaron utilizando SDS-PAGE (acrilamida 10%) y se tiñen utilizando azul brillante de Coomassie. WT: cepa hospedadora; n. ind e ind.: -/+ IPTG; M: estándar de tamaño de proteína.

15 La figura 14 muestra la actividad de BglA inducible (pET) versus constitutiva (pJM). Las células se incuban utilizando p-nitrofenol-glucopiranosido durante 1 h a 60°C y pH 6. Después de la incubación la alcalinización se llevó a cabo con carbonato de sodio. El p-nitrofenolato resultante se 20 detectó a 400 nm. Blanco: amortiguador + sustrato (sin células). WT: cepa hospedadora (sin plásmido). La figura muestra MW $\pm$ SD; n = 3.

La figura 15 muestra la actividad de BglA y el control sin sentido (CelK). Las células se mezclan con 25 p-nitrofenol-glucopiranosido y se incuban a 60°C y pH 6.

El p-nitrofenolato resultante se detecta después de 15, 30, 45 y 60 min a 400 nm. La alcalinización se llevó a cabo de antemano con carbonato de sodio. La cepa hospedadora *E. coli* BL21(DE3) se utilizó como control. Blanco: amortiguador +
5 sustrato (sin células). La figura muestra $MW \pm SD$; $n = 3$.

La figura 16 es una prueba de la presentación en superficie de la proteína de fusión BglA en *E. coli* BL21(DE3). Las proteínas de membrana exterior se aíslan utilizando fraccionamiento de célula diferencial, se separan
10 utilizando SDS-PAGE (acrilamida 10%) y se tiñen utilizando azul brillante de Coomassie. M: estándar de tamaño de proteína; WT: cepa hospedadora; PK: Proteinasa K. La digestión de células completas con PK se llevó a cabo antes del aislamiento de proteína de membrana exterior.

15 La figura 17 muestra la actividad de CelK a pH 5 y pH 6. La actividad de CelK se determinó a 60°C y pH 5 y pH 6 por medio de incremento de p-nitrofenolato a 400 nm. Se utilizó p-nitrofenol-celobiósido como sustrato y se utilizó como control la cepa hospedadora *E. coli* BL21. La figura 17
20 muestra $MW \pm SD$; $n = 3$.

La figura 18 muestra la actividad de CMCasa en la cepa Cel5A. La cepa Cel5A y la cepa hospedadora *E. coli* BL21(DE3) se mezclan con CMC 1% y se incuban a 60°C y pH 6. Después de períodos de incubación variables los azúcares
25 reductores formados se detectan por medio de análisis DNS a

540 nm. Células blanco (BZ): células únicamente (sin CMC); sustrato en blanco (BS): CMC + amortiguador únicamente (sin células). La figura 18 muestra $MW \pm SD$; $n = 3$.

Las figuras 19A-19B muestran la actividad de avicelasa de la cepa CelK en presencia y ausencia de una beta-glucosidasa. La cepa CelK se mezcla, en presencia y ausencia de beta-glucosidasa (+/-) elaborada de almendras con Avicel 1% y se incuba a 60°C y pH 6. Después de intervalos variables, los azúcares reductores que se forman se detectan por análisis de DNS a 540 nm. La cepa hospedadora E. coli BL21 se utiliza como control. Fig. 19A: valores de absorción a 540 nm. Células blanco (BZ): células únicamente (sin Avicel); sustrato en blanco (BS, por sus siglas en inglés): Avicel + amortiguador únicamente (sin células). Fig. 19B: azúcares reductores formados por la cepa CelK, en mg glucosa/ml. Las figuras 19A-19B muestran $MW \pm SD$; $n = 3$.

Las figuras 20A-20B muestran la actividad en papel filtro (FP, por sus siglas en inglés) de las celulasas de autopresentación a escala de placa de microtitulación. Las celulasas se incuban en diversas relaciones con una placa FP (2.4 mg) a 60°C. Las mezclas sin BglA contienen 0.5 U/ml de beta-glucosidasa de almendras. Después de período de incubación variables los azúcares reductores formados se detectan por medio del análisis DNS a 540 nm. Fig. 20A: Valores de absorción a 540 nm. WT: cepa hospedadora; sustrato

en blanco (BS): FP + amortiguador (sin células). Fig. 20B: Azúcares reductores formados por celulasas, en mg de glucosa/ml. Las figuras 20A-20B muestran MW $\pm$ SD; n = 2.

Las figuras 21A-21B son la actividad en papel
5 filtro (FP) de las celulasas de autopresentación. Escala de microtitulación versus estándar. Las celulasas se mezclan en partes iguales y se incuban ya sea a 2.4 mg de placa de papel filtro (micro) o con 50 mg de una tira de papel filtro (estándar) durante 3 días a 60°C. Los azúcares reductores
10 formados se detectan por medio de un análisis DNS a 540 nm. Fig. 21A: valores de absorción a 540 nm. WT: cepa hospedadora; sustrato en blanco (BS): FP + amortiguador (sin células). Fig. 21B: azúcares reductores formados por las celulasas, en mg de glucosa/ml. Las figuras 21A-21B muestra
15 MW $\pm$ SD; n = 2.

La figura 22 muestra la degradación de álamo por celulasas de autopresentación. Las celulasas se mezclan en partes iguales y se incuban con álamo 4% durante 88 h a 60°C. Los azúcares reductores formados se detectaron por medio del
20 análisis DMS a 540 nm. La figura 22 muestra MW $\pm$ SD; n = 2.

EJEMPLOS

GENERALIDADES

Las celulasas se ligan como "pasajeros" en el casete de autopresentación, de manera que la proteína se
25 expresa como proteína de fusión. La figura 1 muestra la

estructura esquemática de esta construcción. El casete de autopresentación se encuentra en diversos sistemas de expresión de manera que para la clonación de los pasajeros de celulasa, en primer lugar se utilizan dos sistemas de autopresentación inducibles - IPTG (derivado de pET) y arabinosa (derivado de pBAD) - y uno constitutivo (derivado de pJM).

Las secuencias de genes de las tres celulasas se adaptan al "uso de codón" de *E. coli* y se sintetizan por Life Technologies (síntesis de genes GeneArt^{MR}). Las secuencias de gen optimizadas y las secuencias de aminoácidos derivadas de los mismos están en el protocolo de secuencia. Los genes se insertan en los vectores de autopresentación utilizando las interfases unidas Xho I y Kpn I. Para cada celulasa, se utiliza un sistema de autopresentación tanto inducible como constitutivo. En el caso del sistema inducible, el vector pET autopresentación se utiliza para la endocelulasa Cel5A y la β -glucosidasa BglA. Puesto que CelK, a 2.4 kb es muy grande, el vector de autopresentación pBAD se utiliza para CelK puesto que es más pequeño en comparación con el vector de autopresentación pET. Los plásmidos de celulasa de autopresentación generados son todos por lo tanto < 10 kb y se resumen en la Tabla 1. Las tarjetas de plásmido respectivas se muestran en la figura 2 a la figura 4.

TABLA 1:

Celulasa	Gen (pb)	Plásmido	Fp (kDa)	Cepa de <i>E. coli</i>
Cel5A	1422	pET-AT-Cel5A pJM-AT-Cel5A	102	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pET-AT-Cel5A <i>E. coli</i> BL21pJM-AT-Cel5A
Cel5K	2382	pBAD-AT-CelK pJM-AT-CelK	139	<i>E. coli</i> BL21pBAD-AT-CelK <i>E. coli</i> BL21pJM-AT-CelK
BglA	1353	pET-AT-BglA pJM-AT-BglA	101	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pET-AT-BglA <i>E. coli</i> BL21pJM-AT-BglA

Los plásmidos inducibles por IPTG (derivados de pET) se transforman en *E. coli* BL21(DE3) (B, F-, dcm, ompT, lon, hsdS (rB- mB-) gal, λ (DE3)). Para los plásmidos inducibles por arabinosa (derivados de pBAD) y constitutivos (derivados de pJM) se utiliza *E. coli* BL21 (B, F-, dcm, ompT, lon, hsdS (rB- mB-) gal). Las cepas de *E. coli* generadas también se enumeran en la Tabla 1.

CONDICIONES DE EXPRESION PARA CELULASAS

La expresión de las proteínas de fusión de celulosas inducen ya sea al agregar IPTG o con L-arabinosa. En el caso de expresión constitutiva, no necesita agregarse inductor. Las condiciones de expresión de las cepas de celulasa generadas (véase Tabla 1) se enumeran en la Tabla 2. Se agrega IPTG o L-arabinosa tan pronto como el cultivo principal alcanza una DO₅₇₈ de 0.5 - 0.6.

TABLA 2

Cepa	Expresión de la proteína de fusión de celulasa
Derivados de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pET-AT	Inducción con IPTG 1 mM durante 1 h a 30°C
Derivados de <i>E. coli</i> BL21pBAD-AT	Inducción con L-arabinosa 0.2% durante 4 h a 37°C
Derivados de <i>E. coli</i> BL21pJM-AT	Cultivo durante 24 h a 37°C (expresión constitutiva)

Con el fin de excluir cualquier influencia de

punto de disulfuro periplásmicos en el transporte de celulasa, las células se cultivan con β -mercaptoetanol (ME) 10 mM. Las células se cultivan si ME son las que se utilizan como comparación.

5

EJEMPLO 1: ENDOCELULASA Cel5A

Las cepas Cel5A (*E. coli* BL21(DE3)pET-AT-Cel5A y *E. coli* (BL21pJM-AT-Cel5A) se hacen crecer de acuerdo con la Tabla 2 sin y con ME y se preparan para ya sea prueba de actividad o para aislamiento de las proteínas de membrana exterior.

10

Actividad de Cel5A: inducible versus constitutiva

La actividad de la endocelulasa se detecta utilizando el análisis de placa CMC. Esto involucra producir placas de agar que consisten de amortiguador de análisis y sustrato (carboximetilcelulosa). Se gotean 10 μ l de células (DO₅₇₈20) sobre cada una de las placas y después se incuban a 50°C. Las placas CMC se tiñen utilizando rojo Congo, el cual tiñe las cadenas de polisacárido con $n > 6$ monómeros. Para finalizar las placas se decoloran utilizando NaCl. Si se descompone CMC, se forma un halo ligero alrededor de las células mientras que las moléculas de CMC no hidrolizadas continúan proporcionando una tinción rojo oscuro.

15

20

Con el fin de determinar el período de incubación óptimo a 50°C, se selecciona una serie de 0.5 - 2 h. Además de las cepas de celulasa, el hospedador también se prueba

25

para degradación de CMC. Los resultados muestran que la cepa Cel5A inducible provoca degradación de CMC dependiente del tiempo (los halos se vuelven más grandes conforme se incrementa el período de incubación). Contrario a esto, no se detecta degradación de CMC con la cepa Cel5A constitutiva. Como se anticipaba, el hospedador no muestra degradación de CMC. La adición de ME durante el crecimiento no tiene efecto.

El experimento muestra que la degradación de CMC es posible con la cepa Cel5A inducible. El crecimiento de las células puede producirse sin agregar mercaptoetanol. Es suficiente un período de incubación de 30 min para las placas de CMC.

Actividad de Cel5A: Control sin sentido

Con el fin de excluir cualquier influencia del β -barril en la actividad de Cel5A, el análisis de placa de CMC también se lleva a cabo con células las cuales presentan un pasajero diferente en la superficie el cual no es capaz de degradar CMC. Esta cepa en lo siguiente se denominará como control sin sentido. También se realiza una prueba de manera que el promotor sea "holgado". Esto significa que la proteína de fusión Cel5A se debe expresar incluso sin la adición del inductor. Para hacerlo así, la cepa Cel5A no se induce y la actividad se compara con células inducidas. La prueba demuestra que la cepa Cel5A no inducida presenta ligera degradación de CMC. Esto muestra que, sin el inductor, se produce cierta cantidad de expresión de la proteína de fusión

Cel5A. La degradación de CMC de la cepa Cel5A inducida, no obstante, es marcada de manera más fuerte. El control sin sentido no muestra degradación de CMC, exactamente como lo realiza la cepa hospedadora sin el plásmido. Este halo
5 marcado muy ligeramente en el control sin sentido y el hospedador es comparable con la muestra de amortiguador. Así, esta es una reacción no específica del amortiguador a la placa de agar.

Con el fin de garantizar el número de moléculas de β -barril de la cepa Cel5A y el control sin sentido son
10 comparables, las proteínas de membrana exterior se aislaron de las células probadas y se separaron utilizando SDS-PAGE. Las proteínas de membrana exterior de *E. coli* Ompf (37 kDa) y OmpA (35 kDa) se utilizan como proteínas marcadores para la fracción de membrana exterior. El resultado se muestra en la
15 figura 5. Después de inducción con IPTG, se detectaron bandas comparablemente fuertes para la proteína de fusión Cel5A y la proteína de fusión del control sin sentido, las cuales corresponden bien con el MW calculado de aproximadamente 102 kDa y 96 kDa. Con la cepa Cel5A no inducida, no se
20 detectaron bandas para la proteína de fusión Cel5A. De igual manera, como se anticipaba, el hospedador no mostró bandas para la proteína de fusión Cel5A y el control sin sentido.

Por lo tanto se demostró que la degradación de CMC causada por la cepa Cel5A involucra una reacción de celulasa
25 específica.

Estabilidad de almacenamiento de la cepa Cel5A

Con el fin de probar si la cepa Cel5A puede ser almacenada a 4°C, se determinó la actividad de las células a partir de la prueba 3.2 después de 10 días de almacenamiento.

- 5 Fue evidente de la prueba que la cepa Cel5A almacenada no muestra pérdida de actividad en este período. La degradación de CMC es comparable con células frescas. El hospedador y el control sin sentido no mostraron degradación de CMC.

- La prueba muestra que es posible almacenar la cepa Cel5A
10 durante por lo menos 10 días a 4°C sin pérdida de actividad.

Presentación en superficie de la cepa Cel5A

- La expresión exitosa de la proteína de fusión Cel5A se ha demostrado en lo anterior. La detección de la proteína de fusión en la membrana exterior, no obstante, aún no
15 proporciona conclusión alguna respecto a su orientación. Como se desea las enzimas pueden estar orientadas hacia el espacio extracelular o hacia el periplasma. Al incubar células de bacteria intactas con proteinasa K seguido por preparación de las proteínas de membrana exterior bacteriana, es posible
20 detectar la presentación en superficie de un pasajero de autopresentación. Puesto que las moléculas de proteinasa K son incapaces, debido a su tamaño, de pasar a través de la membrana exterior de *E. coli*, la incubación de células completas con estas proteasas simplemente resulta en la
25 digestión de proteínas localizadas sobre la superficie de la

membrana exterior. Las proteínas de membrana exterior OmpF y OmpA están protegidas de la digestión por proteasas dado que son proteínas de membrana integral. Por lo tanto, su detección después de tratamiento con proteasa se puede
5 considerar como un índice de la integridad de las células.

Con el fin de detectar la presentación en superficie, la cepa Cel5A se incubaba con proteinasa K, posterior a inducción de la expresión Cel5A. Las células inducidas se utilizan como comparación la cual no ha sido
10 tratada con la proteasa. La cepa hospedadora *E. coli* y la cepa Cel5A no inducida se utilizan como controles. En la figura 6 se puede observar la fuerte expresión, ya demostrada, de la proteína de fusión Cel5A después de inducción de IPTG a aproximadamente 102 kDa (véase la figura
15 4). Como se anticipaba, ni la cepa hospedadora *E. coli* ni la cepa Cel5A no inducida se detectó la expresión en aproximadamente 102 kDa. Debido a la fuerte expresión de Cel5A, es difícil una degradación proteolítica completa de la proteína de fusión Cel5A. La reducción en las bandas Cel5A
20 con el mantenimiento simultáneo de las bandas OmpF y OmpA posterior al tratamiento con proteasa indica con claridad a favor de una orientación hacia fuera de Cel5A.

EJEMPLO 2: EXOCELULASA CelK

Las cepas CelK (*E. coli* BL21pBAD-AT-CelK y *E. coli*
25 BL21pJM-AT- Cel5K) se cultivan de acuerdo con la Tabla 2 sin

y con mercaptoetanol y se preparan para ya sea una prueba de actividad o para aislamiento de las proteínas de membrana exterior.

Actividad de Cel5A: Análisis de p-nitrofenolato

5 La actividad de la exocelulasa se determina fotométricamente por medio de un incremento en p-nitrofenolato. Se utiliza como sustrato el celobiósido p-nitrofenol. En la literatura se ha descrito para el p-nitrofenolato un máximo de absorción de 380-420 nm. Con el
10 fin de determinar la longitud de onda óptima para la medición de p-nitrofenolato, en primer lugar se registra un espectro bajo condiciones de análisis de CelK. Para hacer esto, se agrega p-nitrofenol a amortiguador de citrato de sodio a pH 6 y se incuba a 60°C. Puesto que la coloración amarillo del
15 p-nitrofenolato es notoria de manera más fuerte cuando es alcalina, la muestra se alcaliniza adicionalmente con carbonato de sodio y después se mide fotométricamente en la placa de microtitulación. La figura 7 muestra que bajo condiciones de CelK, es posible una medición de
20 p-nitrofenolato en aproximadamente 360 a 450 nm. En base en la literatura se define una medición de absorción a 400 nm para el siguiente análisis de CelK.

Con el fin de determinar la actividad de la cepa CelK, se realiza una curva estándar con p-nitrofenolato (0 mM
25 a 1 mM). Las muestras de p-nitrofenolato se tratan de la

misma manera que las muestras de CelK y se miden no diluidas y diluidas 1:2, respectivamente.

Actividad de CelK: Constitutiva versus inducible

Las pruebas preliminares de CelK han demostrado que
5 la cepa CelK inducible presenta mayor actividad en
comparación con la cepa CelK constitutiva. Con el fin de
determinar una relación precisa, las actividades se
determinan en una comparación directa. Los resultados se
muestran en la figura 8. Para la cepa CelK inducible,
10 utilizando una curva estándar, se determina la actividad de
210 mU/DO₅₇₈1/ml. Para la cepa CelK constitutiva, después de
3 min a 60°C, no se observa conversión en la DO₅₇₈1 utilizada.
Por lo tanto, la cepa CelK constitutiva (DO₅₇₈1) se incuba
durante 30 min a 60°C. Ahora se determina la absorción a
15 400 nm de 0.25, la cual corresponde a una actividad de
2.2 mU/DO₅₇₈1/ml. La cepa CelK inducible por lo tanto es
aproximadamente 100 veces más activa por comparación con la
cepa CelK constitutiva. Las otras pruebas por lo tanto
continúan con la cepa CelK inducible (cultivo sin
20 mercaptoetanol).

Actividad de CelK: Control sin sentido

De la misma manera que la endocelulasa, un control
sin sentido para actividad también se prueba para la
exocelulasa. La figura 12 muestra que la DO₅₇₈ de la cepa CelK
25 en la mezcla debe ser ≤ 1 . En la siguiente prueba, se

determina $DO_{578}0.5$. Puesto que la formación de p-nitrofenolato es de antemano muy marcada después de aproximadamente 3 min (véase la figura 8), se selecciona para esta prueba una serie en tiempo de 0 a 4 min. Para realizar esto, la cepa CelK, el control sin sentido y la cepa hospedadora se mezclan con celobiósido p-nitrofenol y después de cada minuto, el p-nitrofenolato formado se mide a 400 nm. Las muestras se diluyen 1:2 antes de alcalinización. El resultado se muestra en la figura 9. Surge que la $DO_{578}0.5$ es suficiente para la medición de actividad. Para la cepa CelK, utilizando la curva estándar (diluida 1:2), se calcula una actividad de aproximadamente 300 mU/ $DO_{578}1$ /ml. Se observan los primeros 3 min. Después de esto, la reacción ya no es lineal. El control sin sentido mostró, como lo hizo la cepa hospedadora, que no hay conversión del sustrato.

Con el fin de verificar si la expresión de la proteína de fusión CelK y de la proteína de fusión del control sin sentido son las mismas, además de la prueba de actividad, las proteínas de la membrana exterior se aislaron y se separaron utilizando SDS-PAGE. Las proteínas de membrana exterior de *E. coli* OmpF (37 kDa) y OmpA (35 kDa) se utilizaron como proteínas marcadoras para la fracción de membrana exterior. Los resultados se muestran en la figura 10. Después de inducción con arabinosa, se detectaron bandas comparablemente fuertes para la proteína de fusión

CelK y la proteína de fusión del control sin sentido, lo cual corresponde bien al MW calculado de aproximadamente 139 kDa y 103 kDa. No se observaron en la cepa hospedadora bandas de las dos proteínas de fusión.

5 Esta prueba demostró que la conversión de p-nitrofenolato es una reacción específica de CelK.

Estabilidad al almacenamiento de la cepa CelK

Con el fin de probar si la cepa CelK puede ser almacenada a 4°C, la actividad de las células de la prueba anterior se determinó después de 8 días de almacenamiento. La figura 11 muestra que la cepa CelK almacenada no muestra pérdida de actividad en este período. La formación de p-nitrofenolato es comparable con células frescas (figura 9). Aquí, también, se obtiene una actividad de aproximadamente 15 300 mU/DO₅₇₈1/ml. El hospedador y el control sin sentido no mostraron conversión del sustrato.

La prueba demostró que es posible almacenar la cepa CelK por al menos 8 días a 4°C sin pérdida de actividad.

Presentación en superficie de la cepa CelK

20 La expresión exitosa de la proteína de fusión CelK ya se ha demostrado en la figura 10. Con el fin de confirmar las orientaciones afuera de la enzima, la cepa CelK se trata con proteinasa K y después se aíslan las proteínas de membrana exterior. OmpF y OmpA se consideran como prueba de la integridad de las 25 células después del tratamiento de proteasa.

La cepa CelK se incubó con proteinasa K después de inducción de la expresión de CelK.

Las células inducidas las cuales no han sido tratadas con proteasa se utilizan como comparación. La cepa hospedadora *E. coli* y la cepa CelK no inducida se utilizan como controles. En la figura 12, la fuerte expresión de la proteína de fusión CelK se muestra de antemano, posterior a inducción con arabinosa en aproximadamente 139 kDa, como se puede observar. Como se anticipó, ni la cepa hospedadora *E. coli* ni la cepa CelK no inducida detectaron expresión en aproximadamente 130 kDa. Debido a la fuerte expresión de CelK es difícil una degradación proteolítica completa de la proteína de fusión CelK. La banda CelK pudo haber desaparecido completamente, pero la banda OmpA es en cierta medida más débil en comparación con la cepa hospedadora. No obstante, esto indica claramente a favor de una orientación hacia fuera de la enzima.

EJEMPLO 3: BETA-GLUCOSIDASA BglA

Expresión y actividad de BglA: Inducible versus constitutiva

La expresión de la proteína de fusión, en el caso del sistema constitutivo, se llevó a cabo durante 24 h a 37°C. La inducción de la expresión en el sistema pET se obtiene por medio de incubación durante 1 hora de las células con IPTG 1 mM a 30°C, una vez que se ha obtenido una DO_{578} de 0.6. No hay necesidad de agregar β -mercaptoetanol 10 mM

durante el cultivo, dado que la secuencia de aminoácidos de BglA contiene únicamente una cisteína y de esta manera no se pueden formar puentes disulfuro en el periplasma lo cual puede afectar el transporte.

5 Una vez que se han generado dos cepas BglA (inducida y constitutiva) la expresión de la proteína de fusión BglA en la membrana exterior de *E. coli* debe verificarse. Para hacer esto, las proteínas de membrana exterior de ambas cepas se aíslan y separan utilizando
10 SDS-PAGE. Las proteínas de membrana exterior de *E. coli*, OmpF (37 kDa) y OmpA (35 kDa) se utilizan como proteínas marcadores para la fracción de membrana exterior. Los resultados se muestran en la figura 13. En el caso del sistema de expresión inducible, posterior a inducción con
15 IPTG se detecta una banda fuerte de la proteína de fusión BglA, lo cual corresponde bien al MW calculado de aproximadamente 101 kDa. Para la cepa BglA no inducida y para la cepa hospedadora, como se anticipó no se pudo detectar una banda para la proteína de fusión BglA. En el sistema
20 constitutivo, no se detectó expresión de la proteína de fusión BglA. La experiencia ha demostrado que la detección de un pasajero expresado constitutivamente por medio de tinción de Coomassie no es suficientemente sensible.

 Una vez que la expresión de la proteína de fusión
25 BglA se ha verificado, la actividad de BglA de la cepa

constitutiva e inducible se determinó por medio de p-nitrofenol-glucopiranosido como sustrato. La actividad de la cepa BglA se determina fotométricamente por medio de la formación de p-nitrofenolato a 400 nm. Contrario a la exocelulasa CelK, se utiliza como sustrato p-nitrofenol-glucopiranosido. Con el fin de establecer el análisis, la prueba se lleva a cabo en primer lugar utilizando una β -glucosidasa adquirida (de almendra). Para hacerlo de esta manera, se selecciona las condiciones óptimas para esta enzima (pH 5 y 35°C). Se utilizan dos concentraciones diferentes. Se detecta una actividad dependiente de concentración de la β -glucosidasa. Como se anticipó, el blanco no muestra incremento en p-nitrofenolato.

La actividad de BglA se determinó por medio de medición de absorción del p-nitrofenolato producido a 400 nm (cambio de color a amarillo). La reacción se lleva a cabo, en base en lo publicado, en condiciones óptimas para BglA a un valor de pH de 6.0 y una temperatura de incubación de 60°C. Puesto que el período de incubación de la cepa BglA con el sustrato no se conoce, las mezclas de reacción se incuban hasta que se puede observar una coloración amarillo claro (p-nitrofenolato). En el caso de la cepa BglA inducible, esto se registra después de 1 h a 60°C. Antes de la medición fotométrica, las células se separan y el sobrenadante se transfiere a una placa de microtitulación de 96 pozos.

Después de alcalinización al agregar carbonato de sodio, la medición de absorción se llevó a cabo a 400 nm. En la figura 14, se puede ver que la cepa BglA inducible es capaz de convertir p-nitrofenol-glucopiranosido (incremento de p-nitrofenolato a 400 nm). Contrario a esto, la cepa BglA constitutiva no muestra formación de p-nitrofenolato dentro de 1 h a 60°C. No se ha intentado un período de incubación más prolongado. Tanto el blanco como la cepa hospedadora no mostraron conversión del sustrato. Al igual que con otras dos celulasas, se obtiene mejor actividad con el sistema de expresión inducible.

Actividad de BglA: control sin sentido

Una vez que se ha demostrado que la cepa BglA inducible es activa, se registra una serie en tiempo con el fin de poder determinar mejor la actividad. Al mismo tiempo, correspondiente a otras dos celulasas, también se prueba un "control sin sentido". Esta es una cepa *E. coli*, la cual presenta un pasajero diferente en la superficie el cual no puede convertir el sustrato. Se selecciona la cepa CelK. Aunque esta es una celulasa, CelK no puede convertir p nitrofenol glucopiranosido. Con el fin de determinar la actividad de BglA, en primer lugar, se registra una curva estándar para p-nitrofenol. Después, la cepa BglA, el control sin sentido (cepa CelK) y la cepa hospedadora se mezcla con p-nitrofenol glucopiranosido y después de hacer variar los

períodos de incubación a 60°C, el p-nitrofenolato formado se mide a 400 nm. En la figura 15, se puede observar que la cepa BglA muestra un incremento continuo en p-nitrofenolato con respecto al tiempo. Utilizando la curva estándar, se calcula la actividad de BglA de aproximadamente 1 mU/ml/D01. El control sin sentido, al igual que la cepa hospedadora *E. coli* BL21(DE3) no muestra conversión del sustrato.

Presentación de superficie de BglA en *E. coli* (BL21(DE3))

La actividad exitosa BglA de la cepa inducible se muestra en la figura 14, mientras que la expresión de las proteínas de fusión BglA se ilustra en la figura 13. Con el fin de detectar la presentación de superficie, la cepa BglA se incubaba con proteinasa K después de inducción de expresión de BglA. La proteasa, debido a su tamaño, es incapaz de obtenerse en la célula de *E. coli* y por lo tanto únicamente degrada proteínas las cuales están en la superficie de la célula. Como comparación, se utilizaron células inducidas las cuales no han sido tratadas con proteasa. La cepa hospedadora de *E. coli* y la cepa BglA no inducida se utilizan como controles. OmpA y OmpF son proteínas de membrana integrales las cuales están protegidas contra digestión por proteasas. Por lo tanto, estas sirven como un índice para la integridad de las células. En la figura 13, la expresión fuerte mostrada de antemano de la proteína de fusión BglA posterior a la inducción por IPTG en aproximadamente 101 kDa se puede

observar. Como se anticipó, la expresión de aproximadamente 101 kDa no se detectó ni en la cepa hospedadora de *E. coli* ni en la cepa de BglA no inducida (figura 16). Debido a la fuerte expresión de BglA, es difícil la degradación proteolítica completa de la proteína de fusión BglA. La reducción de bandas BglA mientras las bandas OmpF y OmpA se mantienen después del tratamiento de proteasa, de acuerdo con nuestra experiencia, indica claramente a favor de una orientación hacia fuera de BglA.

10

EJEMPLO 4

15

Con la ayuda de la tecnología de autopresentación, es posible presentar tres celulasas activas en la superficie de *E. coli*. En todos los casos, un sistema de expresión inducible es lo mejor. Las cepas de celulasa y su cultivo se resumen en la Tabla 2.

20

Con el fin de utilizar las celulasas de autopresentación juntas para una degradación sinérgica de celulosa, se deben definir parámetros comunes tales como valor de pH y temperatura. La exocelulasa y β -glucosidasa tienen un pH óptimo de 6.0. La temperatura óptima es 60°C. No obstante, la endocelulasa tiene un pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de 50°C.

Determinación de la temperatura común

25

Puesto que dos de las tres celulasas (CelK y BglA) tienen una temperatura óptima de 60°C, es necesario probar si

la endocelulasa Cel5A también es activa a 60°C. En la literatura, se describe una ligera reducción en la actividad de Cel5A (aproximadamente 5 a 10%) a 60°C, en comparación con la actividad a 50°C (Lin L et al., 2009). La actividad de Cel5A se determina utilizando las pruebas en placa de CMC a pH 5. Esto se realiza al gotear células Cel5A sobre la placa de CMC y después incubar durante 30 min a 50°C, 55°C y 60°C. La cepa hospedadora *E. coli* BL21(DE3) y el amortiguador se utilizaron como control. Las placas de CMC se tiñieron utilizando rojo Congo. Finalmente, las placas se decoloraron con NaCl. Se encontró que la célula Cel5A se degradan igualmente bien a cada temperatura de CMC utilizada (halo ligero) mientras que la cepa hospedadora y el amortiguador fueron negativos. Las células Cel5A por lo tanto también se pueden utilizar a 60°C. En el pasaje siguiente por lo tanto, la investigación con la totalidad de las tres celulasas se llevó a cabo a 60°C.

Determinación del valor de pH común

La exocelulasa (CelK) y β -glucosidasa (BglA) tienen un pH óptimo de 6. No obstante, la endocelulasa (Cel5A) tiene un pH óptimo de 5. La literatura describe una reducción en la actividad de Cel5A a pH 6 en comparación con pH 5 (Lin L et al, 2009). Por lo tanto, fue necesario probar si es posible utilizar CelK a pH 5. Para hacer esto, la cepa CelK, después de inducción de la expresión de proteína, se recolectó

primero en amortiguador de citrato de sodio pH 6 y en segundo lugar el amortiguador de acetato de sodio pH 5. La actividad de CelK se determinó a partir del incremento en p-nitrofenolato 400 nm por degradación de p-nitrofenol celobiósido (pNPC) a 60°C. La cepa hospedadora *E. coli* BL21 se utilizó como control. La figura 17 muestra que bajo ambas condiciones de pH se puede observar un incremento en p-nitrofenolato mientras que la cepa hospedadora permanece sin alteración. También se puede observar que a pH 6, en comparación con pH 5, se produce más p-nitrofenolato. A pH 6, la actividad de CelK en promedio de 270 mU/ml/DO1 se obtiene. No obstante, a pH 5, es únicamente aproximadamente 110 mU/ml/DO1. De manera que una disminución en el pH en el análisis, de pH 6 a pH 5, genera una disminución de 60% en la actividad de CelK.

Una pérdida de actividad también se describe para la endocelulasa Cel5A, cuando el pH se incrementa de 5 a 6. Pero puesto que la β -glucosidasa BglA también tiene un óptimo a pH de 6, los análisis subsecuentes se llevaron a cabo a pH 6 de manera que únicamente una enzima debe ser utilizada bajo condiciones de pH no óptimas.

Detección de los azúcares reductores: Establecimiento del análisis DNS

La actividad de celulasa común de las celulasas de autopresentación se prueba después en sustratos de celulosa. Esto se realiza, por ejemplo, utilizando colorimetría al

medir los azúcares reductores liberados de acuerdo con el método de ácido dinitrosalicílico (Miller GL 1959). El método relaciona la oxidación de un compuesto carbonilo con la reducción de un grupo nitro en ácido 3,5-dinitrosalicílico bajo condiciones alcalinas. Esto involucra reducir ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, el cual tiene un máximo de absorción a 540 nm. En esta reacción, el color de la solución de DNS cambia de naranja-amarillo a rojo.

Actividad de CMCasa de la endocelulasa Cel5A

10 Hasta ahora, la actividad de Cel5A se ha medido indirectamente utilizando la prueba de placa CMC. Al utilizar el método de DNS, los extremos reductores de la carboximetilcelulosa formados se pueden determinar cuantitativamente por la reacción de Cel5A. Para hacer esto, la cepa Cel5A se mezcla con CMC 1% y se incuba a 60°C.

15 Después de períodos de incubación variables las células se separan y el sobrenadante se mezcla con reactivo DNS. Después de la incubación a 95°C y 4°C, se determina la absorción a 540 nm utilizando fotometría. La cepa hospedadora *E. coli* BL21 (DE3) se utiliza como control. Como controles, se

20 utilizan únicamente células (BZ) o únicamente CMC (BS). En la figura 18 se puede observar que la cepa Cel5A forma extremos reductores los cuales se pueden detectar utilizando reactivo DNS. Debido a las sustituciones carboximetilo, la degradación CMC no es una reacción lineal, dado que la endocelulasa es

25 afectada por el grado de sustitución. Por lo tanto, no debe

excederse una tasa de conversión de aproximadamente 5%. Después de 30 min a 60°C, la cepa Cel5A convierte aproximadamente 8% de la CMC. Con el fin de obtener una mejor estimación de la actividad de Cel5A, la incubación a 60°C debe ser < 30 min. La cepa hospedadora y
5 los otros dos controles utilizados, como se anticipaba, no muestran actividad de endocelulasa.

EJEMPLO 5: ACTIVIDAD DE AVICELASA DE LA EXOCELULASA CelK

La actividad de exocelulasa hasta ahora ha sido determinada con p-nitrofenol-celobiósido. Este es un sustrato
10 soluble y por lo tanto fácilmente convertible. Con el fin de probar la actividad de CelK sobre regiones de celulosa cristalinas, se utilizó como sustrato Avicel (celulosa microcristalina). Esto se realizó al incubar la cepa CelK con Avicel 1% a 60°C después de periodos de incubación variables,
15 los azúcares reductores liberados se determinaron por medio del análisis DNS a 540 nm. La concentración de los azúcares reductores se determinó utilizando una curva estándar para glucosa en mg de glucosa/ml. Dado que la exocelulasa libera celobiosa, una β -glucosidasa se agregó durante la conversión
20 de Avicel, la cual degrada la celulosa en dos unidades de azúcares reductores en forma de glucosa. Esto habilita una determinación más precisa de la cantidad de azúcares reductores formados, puesto que esto se calcula en base en la curva estándar en glucosa. Al mismo tiempo, la celobiosa
25 actúa como un inhibidor de la exocelulasa, la cual es

removida utilizando la β -glucosidasa. La conversión de Avicel se analiza en presencia y ausencia de β -glucosidasa de almendras, disponible comercialmente, purificada. La cepa hospedadora *E. coli* BL21 se utiliza como comparación. Como controles únicamente se utilizan células (BZ) o únicamente sustrato (BS). Se puede observar de la figura 19A que la cepa CelK es capaz de degradar celulosa microcristalina. La cepa hospedadora, así como los controles utilizados no mostraron incremento en los azúcares reductores. La concentración de azúcares reductores liberados se muestra en la figura 19B. Como se esperaba, existe una mayor concentración en presencia de β -glucosidasa a partir de almendras, por comparación con la conversión sin β -glucosidasa.

β -glucosidasa BglA: Actividad de pNPGasa

La mezcla de celulasa disponible comercialmente Celluclast^{MR} (Novozymes) contiene celulasas de los hongos *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Esta mezcla cataliza la degradación de celulosa en glucosa, celobiosa y polímeros de glucosa superiores. Para la mejor conversión de celulosa posible, se recomienda el uso adicional de una β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (Novozym^{MR} 188). La dosis escrita es Novozyme Celluclast 1% y Novozym 188 0.2%. Las condiciones óptimas para Celluclast son una temperatura de 50 a 60°C y un valor de pH de 4.5 a 6.0. Por lo tanto, para comparación, las condiciones de reacción de las celulasas de autopresentación de 60°C y pH 6 son las que se adoptan.

La actividad de β -glucosidasa se determinó fotométricamente (actividad de pNPGasa) con p-nitrofenol-glucopiranosido (pNPG) por medio de un incremento en p-nitrofenol-glucopiranosido a 400 nm. Esto se realiza al

5 incubar la cepa BglA (DO₅₇₈20) con pNPG durante 15 min a 60°C. La cepa hospedadora *E. coli* BL21 (DE3) y el amortiguador (blanco) se utilizan como control. Para comparación, se incuban Celluclast 1% y Novozym188 0.2% con pNPG a 60°C. Puesto que después de solo 3 minutos se observa un cambio de

10 coloración amarillo fuerte, el contenido de p-nitrofenolato se mide después de 3 min, en vez de después de 15 min, lo que corresponde a BglA. Celluclast 1% y Novol88 0.2%, en comparación con la cepa BglA, la cual se utiliza en una concentración de DO₅₇₈20, muestra un incremento más fuerte en p-nitrofenolato. Los controles, como

15 se esperaba, no muestran actividad de pNPGasa.

Con la ayuda del estándar de p-nitrofenolato, se calculó la actividad de β -glucosidasa en U/I (véase la Tabla 3). Novozym 188 mostró una actividad 14 veces mejor en comparación con la cepa BglA. Celluclast mostró una actividad

20 12 veces más fuerte.

TABLA 3

Celulasa	U/I
BglA	22
Novozym 188	312
Celluclast	264

Exocelulasa CelK: Actividad de pNPCasa

La actividad de la exocelulasa se determinó fotométricamente, por razones prácticas, con p-nitrofenol-celobiósido (pNPC) por medio de un incremento en p-nitrofenolato a 400 nm (actividad de pNPCasa). Esto se realizó al incubar la cepa CelK ($DO_{578}0.5$) y Celluclast (1%) con pNPC durante 4 minutos a 60°C. La cepa hospedadora *E. coli* BL21 y el amortiguador (blanco) se utilizaron como controles. La cepa CelK con una $DO_{578}0.5$ mostró un incremento más fuerte en p-nitrofenolato en comparación con Celluclast 1%. Ambos controles utilizados mostraron, como se esperaba, nula actividad de pNPCasa. Con la ayuda del estándar de p-nitrofenolato, se calculó la actividad de CelK en U/I (véase Tabla 4). La cepa CelK muestra el doble de la actividad de pNPCasa en comparación con Celluclast.

TABLA 4

Celulasa	U/I
CelK	108
Celluclast	52

Endocelulasa Cel5A: Actividad de CMCasa

La actividad de endocelulasa se calcula con CMC al determinar los azúcares reductores por medio del análisis DNS (actividad de CMCasa). Esto se realiza al incubar la cepa Cel5A ($DO_{578}20$) y Celluclast 1% con CMC durante 15 min a 60°C. La cepa hospedadora *E. coli* BL21(DE3) y el amortiguador

(blanco) se utilizan como controles. Con Celluclast se observa una liberación más fuerte de azúcares reductores en comparación con la cepa Cel5A. Con la ayuda de la curva estándar de glucosa, la actividad de CMCasa se calculó en U/I (véase Tabla 5). Celluclast muestra una actividad de CMCasa 2.4 veces mejor en comparación con la cepa Cel5A. No obstante, CMC no es específico para endocelulasas. Las exocelulasas y β -glucosidasas también liberan cantidades pequeñas de azúcares reductores a partir de CMC. Puesto que Celluclast es una mezcla de celulasas de *Trichoderma*, CMC, por sí mismo, se convierte mejor por comparación con la cepa Cel5A, la cual presenta únicamente una endocelulasa en la superficie. La actividad de CMCasa 2.4 veces mejor de Celluclast por lo tanto no iguala a 2.4 veces mejor en la actividad de endocelulasa.

15

TABLA 5

Celulasa	U/I
Cel5A	227
Celluclast	535

EJEMPLO 6: RECICLADO DE CELULASAS DE AUTOPRESENTACION

20

Una ventaja de las celulasas de autopresentación en comparación con las enzimas solubles es que es simple recuperar el catalizador de célula completa de la mezcla de reacción. Las células se sedimentan, resuspenden en un sistema amortiguador apropiado y después están disponibles para conversión adicional. Con el fin de probar si el proceso

25

de reciclado tiene efecto alguno sobre la actividad de las celulasas, después de determinar la actividad básica (ciclo 0) las cepas de celulasa se recuperan un total de dos veces y se mezclan con sustrato fresco (ciclo 1 y 2). El porcentaje de actividad de las cepas de celulasa recicladas se determina por comparación con la actividad básica respectiva.

Reciclado de β -glucosidasa BglA: Actividad de pNPGasa

La actividad de β -glucosidasa se determinó fotométricamente con p-nitrofenol-glucopiranosido (pNPG) por medio de un incremento en p-nitrofenolato 400 nm (actividad de pNPGasa). Esto se realizó al incubar la cepa BglA ($DO_{578}20$) con pNPG durante 15 minutos a pH 6 y 60°C. Después las células se sedimentaron y se midió la actividad nuevamente después de la suspensión (ciclo 1 y 2). La actividad se determinó por medio de un incremento en p-nitrofenolato a 400 nm y representa un valor promedio de tres mediciones individuales. El resultado de las pruebas de reciclado muestra que la actividad de la enzima se mueve, en el ámbito de la desviación estándar, al mismo nivel para todos los ciclos. Por lo tanto, el reciclado no tiene efecto sobre la actividad BglA. La cepa de BglA por lo tanto puede reutilizarse por lo menos dos veces después de ser recuperada de la mezcla de reacción.

Reciclado de Exocelulasa CelK: Actividad de pNPCasa

La actividad de la exocelulasa se determina fotométricamente con p-nitrofenol-celobiósido (pNPC) por

medio del incremento en p-nitrofenolato 400 nm (actividad de pNPCasa). Esto se realiza al incubar la cepa CelK ($DO_{578}0.5$) con pNPC durante 4 minutos a pH 6 y 60°C. Después las células se sedimentan y se mide la actividad nuevamente después de resuspensión (ciclo 1 y 2). La actividad se determinó por medio de un incremento en p-nitrofenolato 400 nm y representa un valor promedio de tres mediciones individuales. El resultado de las pruebas de reciclado muestra que la actividad de la enzima se desplaza, en el ámbito de la desviación estándar, al mismo nivel para todos los ciclos. El reciclado por lo tanto no tiene efecto sobre la actividad de CelK. Al igual que con la cepa BglA, la cepa CelK de esta manera puede ser reutilizada por lo menos dos veces.

15 Reciclado de la endocelulasa Cel5A: Actividad de CMCasa

La actividad de endocelulasa se calculó al determinar los azúcares reductores por medio del análisis DNS (actividad de CMCasa). Esto se realizó al incubar la cepa Cel5A ($DO_{578}20$) con CMC durante 15 minutos a pH 6 y 60°C. Después las células se sedimentaron y la actividad se midió nuevamente después de la resuspensión (ciclo 1 y 2). Los azúcares reductores liberados se detectaron por medio del análisis DNS a 540 nm. Los valores determinados son valores promedio de tres mediciones individuales. La actividad de Cel5A mostró una disminución después de la primera

recuperación de aproximadamente 14% (ciclo 1). Después de otro reciclado (ciclo 2) se registró una caída en la actividad de aproximadamente 63%, por comparación con la actividad básica (ciclo 0). Contrario a la cepa BglA y CelK, el reciclado de la cepa Cel5A se asocia con una reducción en la actividad. Debido a la caída en la actividad después de este primer ciclo es moderada, no obstante, la cepa Cel5A puede ser reutilizada por lo menos una vez.

EJEMPLO 7: ANALISIS DE PAPEL FILTRO (FPA)

El FPA es un método estándar para el análisis de actividad de celulasa en su totalidad (exo-, endocelulasa y β -glucosidasa) y fue desarrollado por Mandels et al en 1976. De acuerdo con la IUPAC (siglas para Unión Internacional De Química Pura y Aplicada) la FPA se lleva a cabo utilizando una tira de papel filtro de 1 x 6 cm (Whatman No. 1) como sustrato estándar (aproximadamente 50 mg) y 1.5 ml de volumen total. La unidad internacional para actividad de papel filtro (FPU, por sus siglas en inglés) se define como micromol de equivalente de glucosa (azúcares reductores) liberados por minuto. Con la FPA, no más de 2 mg de glucosa deben ser liberados a partir de 50 mg de papel filtro (4% de conversión) en 60 min. Debido a la estructura de la celulosa, la degradación no es lineal. Por lo tanto, únicamente una conversión de hasta 4% se describe como lineal. Los azúcares reductores formados se determinan utilizando el método de

DNS. Puesto que la actividad ahora puede ser detectada para cada celulasa de autopresentación, ahora debe investigarse la actividad sinérgica. Esto se realiza al producir una mezcla de la totalidad de las tres celulasas y determinar la actividad FP.

Análisis FP a escala de placa de microtitulación

Debido al volumen total de 1.5 ml y las altas cantidades de reactivo DNS (3 ml por mezcla) que se van a utilizar, la FPA de acuerdo con la IUPAC está muy involucrada si uno decide investigar varias mezclas de celulasa para actividad FP. En la literatura, el análisis FP se describe a escala de placa de microtitulación con un volumen total de 71 μ l (Xiao Z et al, 2004). Para hacer esto, se producen placas FP con la ayuda de un punzón. La relación de volumen de reacción de papel filtro se calcula por medio del área de papel filtro (placa FP versus tira FP). Esto garantiza que incluso a escala de placa de microtitulación, la mezcla se realiza de acuerdo con la IUPAC. Puesto que no se conoce cuál es la mejor relación de mezcla de las celulasas de autopresentación individuales, se prueban diversas mezclas para determinar actividad FP. Mezclas sin la cepa BglA se mezclan con β -glucosidasa a partir de almendras. La cepa hospedadora (BZ) y la placa FP con amortiguador (BS) se utilizan como controles. La actividad de Fpasa se determina después de períodos de incubación variables a 60°C por medio

de los azúcares reductores liberados por medio del análisis DNS. Antes de la medición todas las mezclas se combinan durante 10 min con β -glucosidasa para asegurar que la celobiosa aún no convertida se degrada en glucosa, lo que resulta en una determinación más precisa de los azúcares reductores. Después de separar las células, los azúcares reductores en el sobrenadante se determinan a 540 nm. El resultado se muestra en las figuras 20A-20B. Tanto la mezcla de celulasa con β -glucosidasa disponible comercialmente así como la mezcla con la totalidad de las tres celulasas autopresentadas mostraron una conversión del papel filtro. Después de 5 días de incubación a 60°C, la mezcla 50:50 (CelK:CeI5A) demostró ser la mejor. Los controles utilizados son negativos y no muestran conversión del papel filtro (figura 20A). La cantidad de los azúcares reductores liberados se determina en mg de glucosa/ml utilizando la curva estándar de glucosa (véase la figura 20B). Después de 5 días se obtienen aproximadamente 0.2 mg/ml. Debido a la estructura amorfa y cristalina de la celulosa, la degradación no es una reacción lineal. Con el fin de determinar la actividad de FPasa en FPU/I, por lo tanto, como se establece de acuerdo con la IUPAC, se consultan los valores de medición de 1 h. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

TABLA 6

CelK:Cel5A:BglA	FPU/I
30:70:0	2.01
50:50:0	1.91
70:30:0	2.45
50:25:25	0.90

5

Estándar del análisis FP

Debido al volumen total bajo (71 μ l) utilizado para la conversión de la placa FP, se demostró que es difícil separar las células después de 3 días, dado que la placa FP ha absorbido casi la totalidad del fluido. Por lo tanto, el análisis FP estándar de acuerdo con la IUPAC se lleva a cabo con un volumen total de 1.5 ml. Se utiliza una escala de placa de microtitulación como control. Para hacerlo de esta manera, la totalidad de las tres celulasas de autopresentación se mezclan en la misma relación y se incuban, primero con 1 x 6 cm de tira de papel filtro (estándar) y en segundo lugar con una placa de papel filtro (micro) durante 3 días a 60°C. La cepa hospedadora y el papel filtro sin células (BS) se utilizan como controles. El resultado se muestra en las figuras 21A-21B. Se puede observar que se forman más azúcares reductores en la mezcla estándar después de 3 días a 60°C, en comparación con la mezcla micro. En la mezcla estándar la combinación es mejor, dado que las células están en contacto en todo momento con la tira de papel filtro. En la mezcla micro, la mayor parte de las células están por encima de la placa de papel filtro de manera que no

117

todas las células están en contacto con el FP en todo momento. Los dos controles utilizados mostraron, como se esperaba, actividad nula de FPasa (figura 21A). La cantidad de azúcares reductores liberados se determina con ayuda de la

5 curva estándar de glucosa, en mg de glucosa/ml (véase la figura 21B). En la mezcla micro, después de 3 días a 60°C, se determinan 0.06 mg/ml de azúcares reductores. En contraste, en la mezcla estándar se obtienen 0.38 mg/ml. Debido a un mejor mezclado, por lo tanto, se obtiene un mejor rendimiento de 6.3 veces.

10 **EJEMPLO 8: CONVERSION DE MADERA DE ALAMO**

Se ha demostrado que las celulasas de autopresentación pueden degradar papel filtro (véase las figuras 20A-20B). Puesto que el papel filtro no contiene lignina y únicamente una proporción muy pequeña de

15 hemicelulosa, ahora necesita utilizarse un sustrato más complejo. Para esto, se utiliza álamo tratado con presión de vapor. La hemicelulosa se remueve por el tratamiento previo, aunque la lignina aún está presente. En primer lugar, la lignina forma una barrera física puesto que cubre las

20 superficies de las celulasas y en segundo lugar una barrera química, puesto que las celulasas se pueden unir por lignina y de esta manera, de nuevo, ya no tienen acceso a la celulosa. Con el fin de investigar la degradación de álamo por las celulasas, se mezclan las celulasas de

25 autopresentación en partes iguales y se incuban con álamo 4%

durante 88 h a 60°C. La cepa hospedadora y el álamo en el amortiguador sin células (BS) se utiliza como controles. Después de la incubación, el álamo y las células se sedimentan por centrifugación. El sobrenadante se utiliza
5 adicionalmente para determinar los azúcares reductores formados por medio del análisis DNS. El resultado se muestra en la figura 22. Los sobrenadantes muestran un color amarillento incluso antes de la medición, similar a la del reactivo DNS. Por lo tanto, después de incubación con el
10 reactivo DNS, los valores de absorción a 540 nm son mayores, en comparación con los del análisis FP, en el cual los sobrenadantes son transparentes (véase las figuras 20A-20B). No es posible determinar la concentración, en mg de glucosa/ml, puesto que no existen estándares de glucosa
15 adecuados disponibles. No obstante, una absorción mayor después de 88 h a 60°C se observa con las celulasas en comparación con los dos controles usados. Las celulasas de autopresentación de esta manera son capaces de convertir sustratos incluso más complejos.

20

BIBLIOGRAFIA

Jose and Meyer (2007), Microbiol Mol Biol Rev 71
(4), 600-19.

Jose (2006), Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006, 69,
607-614.

25

Jose et al. (2002), J. Biotechnol. 2002, 95, 257-

268.

Jose et al. (1995), Mol. Microbiol., (2), 378-80.

Ausubel et al. (1995), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers.

5 Henderson et al. (2004), Microbiol, and Molecular Biology Reviews, 68(4), 692-744.

Jose and van Schwichow (2004), ChemBioChem, 5, 491-499.

Banerjee et al. (2002), Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002, 60. 33-44.

Niewert et al. (2001) Diarrhea. Clin. Diagn. Lab. Immunol. (1): 143-149;9.

Lin L, Meng X, Liu P, Hong Y et al (2009) Appl Microbiol Biotechnol 82: 671-679.

15 Miller GL (1959) Analytical Chemistry 31:426-428

Xiao Zhizhuang, Storms R, Tsang A (2004) Biotechnology and Bioengineering 88 (7): 832-837

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

20

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico, caracterizada porque comprende los siguientes componentes:
 - (1) una sección que codifica para un péptido señal,
 - (2) una sección que codifica para una celulasa eteróloga,
 - (3) una sección opcional que codifica para un sitio de
10 reconocimiento de proteasa,
 - (4) una sección que codifica para un enlazante transmembranal, y
 - (5) una sección que codifica para un dominio transportador de un autotransportador o una variante del mismo.
- 15 2. La molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la celulasa es una beta-glucosidasa o una endo- o exocelulasa, que preferiblemente se selecciona del grupo que consiste de endocelulasa de *Bacillus subtilis*, exocelulasa de *Clostridium*
20 *thermocellum* y beta-glucosidasa de *Clostridium thermocellum*.
3. La molécula de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque el dominio transportador de un autotransportador se selecciona del grupo que comprende Ssp, Ssp-h1, Ssp-h2, PspA,
25 PspB, Ssa1, SphB1, AspA/NalP, VacA, AIDA-I, IcsA, MisL, TibA,

Ag43, ShdA, AutA, Tsh, SepA, EspC, EspP, Pet, Pic, SigA, Sat, Vat, EpeA, EatA, EspI, EaaA, EaaC, Pertactina, BrkA, Tef, Vag8, PmpD, Pmp20, Pmp21, proteasa IgA1, App, Hap, rOmpA, rOmpB, ApeE, EstA, Lip-1, McaP, BabA, SabA, AlpA, Aae, NanB y
5 variantes de los mismos.

4. La molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque contiene una secuencia de control de expresión unida operativamente a la molécula de ácido nucleico, la cual de
10 manera preferible puede ser activada al agregar isopropiltioglucopiranósido (IPTG) o arabinosa.

5. Un polipéptido, caracterizado porque es codificado por una molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

15 6. Un microorganismo caracterizado porque expresa en su superficie un polipéptido de conformidad con la reivindicación 5, o ha sido transformado utilizando una molécula de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

20 7. El microorganismo de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque se basa en un microorganismo gramnegativo, preferiblemente *Escherichia coli*.

8. Una fracción de membrana, caracterizada porque se puede obtener a partir de la célula de conformidad con la
25 reivindicación 6 o la reivindicación 7.

9. Un método para producir un producto de reacción utilizando por lo menos una celulasa, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

(i) preparación de un microorganismo de conformidad con la reivindicación 6 ó 7, o una preparación de membrana de conformidad con la reivindicación 8, y

(ii) poner en contacto el microorganismo y/o la preparación de membrana con uno o más sustratos de celulasa bajo condiciones compatibles con la actividad celulasa.

10 10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el producto de la reacción catalizada por la celulasa es un mono- o di- u oligosacárido y en donde por lo menos un sustrato de celulasa es una fuente de polisacárido, preferiblemente una fuente de celulosa.

15 11. El método de conformidad con la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque la etapa (ii) se lleva a cabo a un pH en el intervalo de 4.5 a 6.5, preferiblemente en el intervalo de 5.5 a 6.5.

20 12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque la etapa (ii) se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 30 a 80°C, preferiblemente en el intervalo de 50 a 65°C.

25 13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque en la etapa (ii) se agrega una glucosidasa.

14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, caracterizado porque incluye una etapa adicional (iii) de recuperar el microorganismo utilizado en la etapa (ii).

5 15. Un método para producir un microorganismo, el cual presenta una celulasa recombinante en su superficie, caracterizado porque incluye:

 a) la inserción de una secuencia de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las
10 reivindicaciones 1 a 4, en el microorganismo, y

 b) opcionalmente, el tratamiento del microorganismo con una sustancia la cual activa la expresión de la secuencia de control.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con microorganismos los cuales presentan celulasas en su superficie. Los microorganismos correspondientes se producen
5 con la ayuda de los plásmidos correspondientes los cuales codifican una sección que comprende un péptido señal, una celulasa heteróloga, un sitio de reconocimiento de proteasa opcional, un enlazante transmembranal y un dominio transportador de un autotransportador o una variante del
10 mismo. Los microorganismos ventajosamente se utilizan en la conversión de celulosa en celobiosa y/o glucosa. También es posible recuperar los microorganismos de la mezcla de reacción después de la conversión a través de sustratos sencillos. Además, una combinación de varios microorganismos,
15 los cuales están poblados con exocelulasas, endocelulasas y beta-glucosidasas se utilizan para producir glucosa a partir de celulosa o madera.