



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 265**

51 Int. Cl.:
C12N 9/42 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01973909 .3**
86 Fecha de presentación : **25.09.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1320588**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

54 Título: **Método para la producción de glucosa con una mezcla de celulosa que comprende una celulosa modificada.**

30 Prioridad: **25.09.2000 US 234580 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **logen Energy Corporation**
300 Hunt Club Road
Ottawa, Ontario K1V 1C1, CA

72 Inventor/es: **Foody, Brian;**
White, Theresa, C.;
Tolan, Jeffrey, S. y
Donaldson, Jennifer

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 266 265 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la producción de glucosa con una mezcla de celulasas que comprende una celulasa modificada.

5 La presente invención se refiere a la conversión enzimática de celulosa en glucosa. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para la conversión de sustratos lignocelulósicos pretratados usando proteína CBHI modificada y a la recuperación y la reutilización de la proteína CBHI modificada.

Antecedentes de la invención

10 Una lista completa de referencias puede encontrarse al final de la memoria descriptiva.

15 La celulosa es uno de los polímeros más abundantes encontrados en la naturaleza y consiste en unidades de glucosa conectadas mediante enlaces beta 1,4. Los enlaces beta 1,4 que conectan unidades de glucosa individuales no se degradan o despolimerizan fácilmente. Sin embargo, existe una variedad de enzimas celulasa que son capaces de hidrolizar enzimáticamente la celulosa.

20 Las celulasas son enzimas producidas por un número de microorganismos que catalizan la hidrólisis de celulosa en productos tales como glucosa, celobiosa y otros celo-oligosacáridos. La celulasa es generalmente un término genérico que indica una mezcla de varias enzimas que comprende exo-celobiohidrolasas (CBH), endoglucanasas (EG) y β -glucosidasas. La celulasa producida por los hongos filamentosos *Trichoderma longibrachiatum* comprende al menos dos enzimas celobiohidrolasa denominadas CBHI y CBHII y al menos 4 enzimas EG.

25 Las enzimas celulasa trabajan sinérgicamente para degradar la celulosa en glucosa. CBHI y CBHII actúan generalmente sobre los extremos de los polímeros de glucosa en las microfibrillas de celulosa liberando celobiosa (Teeri y Koivula, 1995), mientras que las endoglucanasas actúan en posiciones aleatorias sobre la celulosa. Juntas, estas enzimas hidrolizan la celulosa en celo-oligosacáridos menores tales como celobiosa. La celobiosa es hidrolizada hasta glucosa por la β -glucosidasa.

30 Los genes que codifican CBHI, CBHII (Shoemaker y otros, 1983; Teeri y otros, 1987), EG I y EG II (Penttila y otros, 1986; Saloheimo y otros, 1988) se han clonado y aislado de hongos filamentosos tales como *T. reesei* y *T. longibrachiatum*. Las CBHI, CBHII y la mayoría de las enzimas EG principales comprenden un dominio central catalítico y un dominio de unión a celulosa (CBD) separados por una región enlazadora flexible. El dominio de unión a celulosa (CBD) promueve la adsorción de la enzima a regiones del sustrato celulósico (Tomme y otros., 1988; Gilkes y otros, 1992), mientras que el dominio central es responsable de catalizar la segmentación de celulosa. La región enlazadora puede asegurar una distancia interdominial óptima entre el dominio central y el dominio de unión a celulosa (Teeri y otros, 1992).

40 Se han producido y estudiado proteínas que consisten en el CBD aislado o la proteína central. Proteínas centrales de CBHI también se encuentran en cantidades de menos de aproximadamente 10% en mezclas de celulasas obtenidas de fuentes naturales. Estudios sobre el dominio catalítico fúngico aislado (proteína central) sugieren que esta proteína es capaz de unirse a celulosa aunque con afinidad reducida en comparación con la proteína natural (holo) (Tomme y otros, 1988). La fuerte unión impartida a las celulasas por su CBD sugiere que la adsorción de varias celulasas a celulosa es esencialmente irreversible (Beldman y otros, 1987; Kyriacou y otros, 1989).

45 La proteína central CBHI de *Trichoderma reesei* no se une tan estrechamente a la celulosa como CBHI. La proteína central de CBHI es completamente activa contra sustratos solubles pequeños tales como los glicósidos cromóforos derivados de las celodextrinas y lactosa. Sin embargo, su actividad contra un sustrato celulósico insoluble tal como Avicel (un tipo cristalino de celulosa) es muy reducida en comparación con CBHI (Van Tilbeurgh y otros, 1986). Van Tilbeurgh mostraba que el núcleo de CBHI era menos de 1% tan activo como CBHI. Esto se atribuyó al hecho de que 88% de la CBHI se adsorbía a la celulosa frente a solo 36% de la proteína central de CBHI. Kim y otros (1997) examinaron la absorción y las actividades de CBHI, el núcleo de CBHI y otras mezclas de proteínas sobre Avicel. Describen que el núcleo de CBHI producía menos de 1/4 la cantidad de azúcar reductor a partir de Avicel que CBHI. La mayor velocidad de hidrólisis mediante CBHI se atribuyó a su mejor unión. En experimentos similares con sauce pretratado con vapor de agua, Kotiranta y otros (1999) observaron una velocidad de hidrólisis drásticamente reducida para el núcleo de CBHI en comparación con CBHI intacta y concluyeron que CBHI necesita un CBD para la adsorción y la hidrólisis eficaces. Nidetsky y otros (1994) observaron tendencias similares entre el núcleo de CBHI y CBHI. Por encima de 80% de la CBHI se adsorbía a papel de filtro de celulosa, en comparación con solo 40% del núcleo de CBHI. Las velocidades de hidrólisis del núcleo y CBHI eran directamente proporcionales a la cantidad de proteína adsorbida, siendo la CBHI por encima de dos veces más activa que el núcleo de CBHI. Estos estudios indican que no existe beneficio en usar núcleo de CBHI en lugar de CBHI para la hidrólisis de celulosa, ya que la actividad del núcleo de CBHI contra celulosa cristalina es mucho más lenta que la de la CBHI.

65 La conversión de celulosa a partir de material celulósico en glucosa es importante en muchos procedimientos industriales, tales como la bioconversión de celulosa en etanol combustible. Desgraciadamente, la celulosa contenida en la mayoría de la materia de la planta no es fácilmente convertible en glucosa, y esta etapa representa un obstáculo principal en la comercialización de tal procedimiento. Se creyó originalmente que la conversión eficaz de celulosa a partir de material celulósico en glucosa implicaba liberar celulosa y hemicelulosa de su complejo con lignina. Sin

embargo, procedimientos más recientes se enfocan a incrementar la accesibilidad a celulosa dentro de la biomasa lignocelulósica seguido por despolimerización de polímeros de carbohidrato de celulosa en glucosa. Incrementar la accesibilidad a la celulosa se acompaña lo más a menudo por precalentar el substrato celulósico.

5 El objetivo de la mayoría de los métodos de pretratamiento es aportar una combinación suficiente de acción mecánica y química, a fin de romper la estructura de las fibras y mejorar la accesibilidad del material de alimentación a enzimas celulasas. La acción mecánica típicamente incluye el uso de presión, trituración, molienda, agitación, picado, compresión/expansión u otros tipos de acción mecánica. La acción química incluye típicamente el uso de calor (a
10 mediante explosión de vapor de agua, usando las condiciones de procesamiento descritas en U.S. 4.461.648 y también en Foody y otros, 1980. En este procedimiento, la biomasa lignocelulósica se carga a una pistola de vapor de agua y hasta 5% de ácido se añade opcionalmente a la biomasa en la pistola de vapor de agua o en una preinmersión anterior a la carga de la pistola de vapor de agua. La pistola de vapor de agua se llena a continuación muy rápidamente con vapor de agua y se mantiene a alta presión durante un espacio de tiempo de cocción fijado. Una vez que transcurre el
15 tiempo de cocción el recipiente se despresuriza rápidamente para expulsar la biomasa pretratada.

Otro enfoque descrito en U.S. 4.237.226 describe el pretratamiento de roble, papel para periódicos, álamo y tallos de maíz mediante un reactor continuo de gasto tipo pistón, un dispositivo que es similar a una extrusora. Tornillos giratorios conducen una suspensión de material de alimentación a través de un pequeño orificio, donde la acción
20 mecánica y química rompe las fibras.

Se ha sugerido que el pretratamiento aumenta la deslignificación del substrato celulósico (Fan y otros, 1981), crea microporos mediante la retirada de la hemicelulosa, cambia la cristalinidad del substrato y reduce el grado de polimerización de la celulosa (Knappert y otros, 1980) e incrementa la superficie específica del substrato celulósico (Grethlein and Converse, 1991; Grohman y otros, 1985).
25

Desgraciadamente, hasta la fecha, el enfoque de un pretratamiento acoplado con hidrólisis enzimática no ha podido producir glucosa a un coste suficientemente bajo, a fin de hacer la conversión de celulosa en etanol comercialmente atractiva. Incluso con el más eficaz de los procedimientos de pretratamiento conocidos actualmente, la cantidad de
30 enzima celulasas requerida para convertir celulosa en glucosa es alta y esto representa un coste significativo en la producción de etanol. La opción de añadir menos celulasas al sistema habitualmente disminuye la cantidad de glucosa producida hasta una extensión inaceptable. El enfoque de disminuir la cantidad de enzima requerida incrementando el espacio de tiempo en el que la enzima actúa sobre la celulosa conduce a una productividad antieconómica del procedimiento, procedente del alto coste asociado con retener las mezclas enzimáticas en depósitos de hidrólisis.
35

Así, existe una necesidad dentro de la técnica de identificar nuevos métodos que potencien la conversión de celulosa dentro de un substrato celulósico en glucosa. Además, existe una necesidad en la técnica de identificar enzimas o mezclas de enzimas que potencien la conversión de celulosa en glucosa y que sean recuperables, reciclables y reutilizables.
40

Un objetivo de la presente invención es vencer las desventajas de la técnica anterior.

El objetivo anterior se cumple mediante una combinación de las características de las reivindicaciones principales. Las subreivindicaciones describen modalidades ventajosas adicionales de la invención.
45

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la conversión enzimática de celulosa en glucosa.

50 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para convertir celulosa en glucosa, que comprende: tratar un substrato lignocelulósico pretratado con una mezcla de enzimas que comprende enzima celulasas y una CBHI modificada, en donde la CBHI modificada está presente en dicha mezcla de enzimas en una cantidad con relación a toda la enzima tipo CBHI de 55 a 100% y el substrato lignocelulósico pretratado comprende al menos 10% de lignina. Preferiblemente, la cantidad de CBHI modificada en la mezcla de enzimas es de 70 a 100%. Más preferiblemente, la cantidad de CBHI modificada en la mezcla de enzimas es de 80 a 100%. Por otra parte, esta invención trata del método anterior en el que la CBHI modificada se recupera después de la etapa de tratamiento. Esta invención trata del método anterior en el que la CBHI modificada se selecciona de núcleo de CBHI, núcleo de CBHI más enlazador y CBHI con dominio de unión a celulosa inactivado y combinaciones de los mismos. Además, la presente invención se refiere al método anterior en el que el substrato lignocelulósico pretratado se pretrata usando una cocción con vapor
60 de agua ácido.

Un aspecto de esta invención trata de un método para convertir celulosa dentro de un substrato celulósico en glucosa, que comprende: tratar un substrato lignocelulósico pretratado con una mezcla de enzimas que comprende CBHI, CBHII, EG I, EG II, β -glucosidasa y CBHI modificada, en donde la CBHI modificada está presente en dicha
65 mezcla de enzimas en una cantidad con relación a toda la enzima tipo CBHI de 55 a 100% y el substrato lignocelulósico pretratado comprende al menos 10% de lignina. Preferiblemente, la cantidad de CBHI modificada en la mezcla de enzimas es de 70 a 100%. Más preferiblemente, la cantidad de CBHI modificada en la mezcla de enzimas es de 80 a 100%. Por otra parte, esta invención trata del método anterior en el que la CBHI modificada se recupera después de

ES 2 266 265 T3

la etapa de tratamiento. Esta invención trata del método que se acaba de describir en el que la CBHI modificada se selecciona de núcleo de CBHI, núcleo de CBHI más enlazador y CBHI con dominio de unión a celulosa inactivado y combinaciones de los mismos.

5 La presente invención abarca métodos como los definidos anteriormente en los que el sustrato lignocelulósico pretratado se selecciona del grupo que consiste en residuos agrícolas, residuos resultantes de la retirada de almidón o azúcar, cultivos para etanol especializados, productos forestales y productos de pasta papelera y papel y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, los residuos agrícolas se seleccionan del grupo que consiste en tallos de maíz, paja de trigo, paja de cebada, tallos de soja; los residuos resultantes de la retirada de almidón o azúcar se seleccionan del grupo que consiste en cáscaras de avena, cáscaras de arroz, bagazo de caña de azúcar y fibra de maíz; los cultivos para etanol especializados se seleccionan del grupo que consiste en mijo perenne, miscantus, espartina y ballico; los productos forestales se seleccionan del grupo que consiste en madera de angiospermas, madera de coníferas, eucalipto y serrín, y los productos de pasta papelera y papel son Solka-floc.

15 La presente invención también se refiere a los métodos de hidrólisis lignocelulósica que se definen anteriormente, en los que el sustrato lignocelulósico se caracteriza por tener un E_i de al menos aproximadamente 0,5 y un R_i de aproximadamente 45 a aproximadamente 100.

20 La invención también incluye los métodos anteriores en los que el E_i es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0 y el R_i es de aproximadamente 60 a aproximadamente 100.

25 También se incluye en la presente invención un método como el definido anteriormente en el que el sustrato lignocelulósico pretratado está presente en la mezcla de enzimas en una concentración de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 25% en peso en suspensión acuosa. Preferiblemente, el sustrato lignocelulósico está presente en la mezcla de enzimas en una concentración de aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 16% en peso en suspensión acuosa.

30 También se describe aquí un método para hidrolizar celulosa en glucosa, que comprende tratar un sustrato lignocelulósico pretratado caracterizado por un E_i de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 con una mezcla de enzimas que comprende enzima celulasa con enzimas tipo CBHI, en donde dichas enzimas tipo CBHI comprenden de 20% a 100% de núcleo de CBHI.

35 Un aspecto del método de la invención puede comprender un método para convertir celulosa dentro de un sustrato celulósico en glucosa, que comprende: tratar un sustrato lignocelulósico pretratado con una mezcla de enzimas que comprende núcleo de CBHI y una o más de CBHII, CBHIII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde el núcleo de CBHI está presente en la mezcla de enzimas en una cantidad con relación a toda la enzima tipo CBHI de 15 a 100%. Preferiblemente, la cantidad de núcleo de CBHI en la mezcla de enzimas es de 50 a 100%, más preferiblemente, la cantidad de núcleo de CBHI en la mezcla de enzimas es de 80 a 100%.

40 Por otra parte, en un aspecto, el método de la presente invención puede comprender un método para convertir celulosa en glucosa, que comprende tratar un sustrato lignocelulósico pretratado con una mezcla de enzimas que comprende núcleo de CBHI más enlazador y una o más de CBHII, CBHIII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde dicho núcleo de CBHI más enlazador está presente en dicha mezcla de enzimas en una cantidad de 50% a 100%, con relación a todas las enzimas tipo CBHI. Preferiblemente, la cantidad de núcleo de CBHI más enlazador en la mezcla de enzimas es de 70 a 100%. Más preferiblemente, la cantidad de núcleo de CBHI más enlazador en dicha mezcla de enzimas es de 80 a 100%.

50 También se describe una composición de celulasas que comprende CBHI modificada y una o más de CBHII, CBHIII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde la CBHI modificada está presente en la composición de celulasas en una cantidad relativa a toda la enzima tipo CBHI de 55 a 100% en peso. La CBHI modificada puede ser de 70 a 100% en peso o puede ser de 80 a 100% en peso. La CBHI modificada de esta composición de celulasas puede ser una CBHI de *Trichoderma* modificada.

55 También se describe una composición de celulasas que comprende una enzima tipo CBHI y una o más de CBHII, CBHIII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde el núcleo de CBHI está presente en la composición de celulasas en una cantidad relativa a toda la enzima tipo CBHI de 15 a 100% en peso. El núcleo de CBHI puede ser de 50 a 100% en peso o de 80 a 100% en peso. El núcleo de CBHI de esta composición de celulasas puede obtenerse a partir de CBHI de *Trichoderma*.

60 También se describe una composición de celulasas que comprende CBHI modificada y una o más de CBHII, CBHIII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en la que la CBHI modificada está presente en la composición de celulasas en de 50 a 90% en peso con relación a las otras enzimas celulasa. La CBHI modificada puede ser una CBHI de *Trichoderma* modificada.

65 Este resumen no describe necesariamente todas las características necesarias de la invención sino que la invención también puede residir en una subcombinación de las características descritas.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

5

La Figura 1 muestra una representación gráfica del porcentaje de conversión de celulosa en glucosa usando diferentes sustratos lignocelulósicos pretratados y cantidades variables de CBHI y proteína de núcleo de CBHI. La Figura 1A muestra la hidrólisis de tallos de maíz lavados pretratados usando cantidades crecientes de CBHI o núcleo de CBHI. La Figura 1B muestra la conversión de cáscaras de avena pretratadas después de 3 horas de incubación usando diversas mezclas de CBHI y proteína de núcleo de CBHI. La Figura 1C muestra una representación gráfica del porcentaje de conversión de celulosa en glucosa a partir de álamo pretratado después de 3 horas de incubación usando diversas concentraciones de proteína de CBHI y núcleo de CBHI.

10

La Figura 2 muestra una representación gráfica del efecto de variar la concentración de sustrato celulósico dentro de una mezcla de reacción. La Figura 2A muestra la hidrólisis de celulosa en glucosa usando concentraciones variables de SIGMACELL™. La Figura 2B muestra la hidrólisis de celulosa en glucosa usando concentraciones variables de álamo pretratado. La Figura 2C muestra un resumen de los datos obtenidos a partir de las Figuras 2A y 2B que compara el E_1 con concentraciones variadas de sustrato.

15

La Figura 3 muestra una representación gráfica de la relación entre la velocidad relativa de hidrólisis de núcleo de CBHI y CBHI, y la cantidad de núcleo de CBHI recuperada de la mezcla de reacción. El alto nivel de recuperación de núcleo de CBHI es un resultado directo de la cantidad de núcleo de CBHI en solución en la mezcla de reacción.

20

La Figura 4 muestra una representación gráfica de la relación de la actividad de CBHI y núcleo de CBHI en mezclas de enzimas celulasa que comprenden CBHI, EG1 (endoglucanasa I) y BG (β -glucosidasa).

25

Descripción de la modalidad preferida

La presente invención se refiere a la conversión enzimática de celulosa en glucosa. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para la conversión de sustratos lignocelulósicos pretratados usando proteína de CBHI modificada y a la recuperación y la reutilización de la proteína de CBHI modificada.

30

La siguiente descripción es de una modalidad preferida solo a modo de ejemplo y sin limitarse a la combinación de características necesarias para llevar a efecto la invención.

35

Se sabe bien en la técnica que la celulosa en muchos materiales lignocelulósicos no puede ser fácilmente hidrolizable mediante enzimas. Así, se prefiere que el sustrato celulósico para la hidrólisis enzimática que se describe aquí se pretrate antes de tratarse con enzimas.

40

Existe un número de procedimientos de pretratamiento conocidos en la técnica que emplean métodos térmicos, mecánicos, químicos o combinaciones de estos para romper la estructura fibrosa de sustratos celulósicos y que potencian la hidrólisis enzimática subsiguiente del sustrato celulósico. Cualquier procedimiento de pretratamiento que potencie la hidrólisis enzimática puede emplearse en combinación con el método de la presente invención. Por ejemplo, pero sin querer limitarse, puede usarse el procedimiento de pretratamiento descrito en U.S. 4.461.648 o U.S. 4.237.226, o cualquiera de los procedimientos de reducción a pasta papelera conocidos dentro de la técnica (por ejemplo, Rydholm S.A. 1985, Pulping Processes, Kreiger Pub. Co), incluyendo reducción a pasta papelera tipo Kraft, al sulfito, mecánica, térmica y químio-térmico-mecánica. Alternativamente, los procedimientos de pretratamiento también pueden implicar la adición de disolventes orgánicos para ayudar a la fraccionación de lignina, celulosa y hemicelulosa a partir de materias primas lignocelulósicas. Estos procedimientos de pretratamiento pueden incluir, pero no se limitan a, los descritos en U.S. 3.932.307, que muestran la impregnación de materia prima lignocelulósica con una solución de reaccionante que solubiliza lignina en un disolvente orgánico y subsiguientemente la inmersión del material impregnado en un disolvente que no es ni soluble ni miscible con la solución que contiene reaccionante con la que se ha impregnado el material lignocelulósico; U.S. 4.826.522, que usa mezclas de disolventes tales como trietilenglicol con ácidos alilsulfónicos u otros; U.S. 5.859.236, que muestra la impregnación de material lignocelulósico con un licor de extracción que contiene un glicol y un ácido de Lewis; y U.S. 5.730.837, que muestra el tratamiento de material lignocelulósico con una combinación de alcohol, agua y disolvente orgánico inmiscible con agua, por ejemplo una acetona.

45

50

55

Un procedimiento de tratamiento preferido es una cocción con vapor de agua ácido, según se describe en U.S. 4.461.648, en la que un ácido, por ejemplo ácido sulfúrico de aproximadamente 0 a aproximadamente 5%, se añade a un sustrato lignocelulósico, y la mezcla acidificada se cuece durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 minutos, a una temperatura de aproximadamente 180 a aproximadamente 250°C.

60

Sin querer limitarse por una teoría, se cree que el procedimiento de pretratamiento potencia la hidrólisis enzimática subsiguiente de celulosa incrementando la deslignificación, creando microporos en la celulosa, cambiando la forma cristalina de la celulosa, reduciendo la polimerización de la celulosa, incrementando la superficie específica de la celulosa, o sus combinaciones. Como una gran porción de la celulosa dentro de muchos tipos de sustrato celulósico normalmente es inaccesible para la conversión enzimática en glucosa sin pretratamiento, la eficacia de la fase

65

ES 2 266 265 T3

de pretratamiento puede influir en la eficacia y la aplicación comercial para convertir enzimáticamente celulosa en glucosa.

Por el término “substrato celulósico” se entiende cualquier material que comprende celulosa que puede convertirse en glucosa mediante hidrólisis enzimática. El substrato celulósico es preferiblemente un substrato lignocelulósico pretratado, que comprende al menos aproximadamente 10% de lignina. Por ejemplo, pero sin querer limitarse, el substrato celulósico adecuado para el pretratamiento puede comprender:

- residuos agrícolas (contenido de lignina aproximadamente 15%) tales como, pero no limitados a, tallos de maíz, paja de trigo, paja de cebada, tallos de soja;
- residuos resultantes de la retirada de almidón o azúcar, por ejemplo, pero no limitados a, cáscaras de avena, cáscaras de arroz, fibra de maíz, bagazo de caña de azúcar, pulpa de caña de azúcar;
- cultivos para etanol especializados, tales como, pero no limitados a mijo perenne, miscantus, espartina, ballico;
- productos forestales, por ejemplo, pero no limitados a, madera de angiospermas (por ejemplo, álamo; contenido de lignina aproximadamente 25%), madera de coníferas (contenido de lignina aproximadamente 35%), eucalipto y residuos forestales, serrín; y
- otros substratos lignocelulósicos pretratados incluyendo productos de pasta papelera y papel, por ejemplo, pero no limitados a, Solka floc,

o combinaciones de los mismos. La madera de angiospermas o los residuos agrícolas pretratados, incluyendo substratos celulósicos de tallos de maíz, cáscaras de avena, paja de cebada o paja de trigo producidos mediante el método descrito en U.S. 4.461.648, son substratos lignocelulósicos preferidos.

La hidrólisis enzimática de celulosa puede seguir al pretratamiento directamente o, alternativamente, un número de etapas puede seguir al pretratamiento y preceder a la hidrólisis enzimática de celulosa, por ejemplo, pero sin querer limitarse, el substrato celulósico pretratado puede lavarse con agua para retirar productos químicos, contaminantes o combinaciones de los mismos que podrían impedir la conversión enzimática de celulosa en glucosa.

Por “CBHI” se entiende una proteína que comprende un dominio de unión a celulosa, una región enlazadora y una región de núcleo de CBHI, o derivados de los mismos, que digiere un polímero de celulosa desde el extremo reductor y libera celobiosa. Un ejemplo no limitativo de un derivado de CBHI es CBHI fosforilada. Hasta la fecha, las enzimas CBHI se han clasificado en la Familia 7 y la Familia 48 y comprenden un intervalo de pesos moleculares. Preferiblemente, la CBHI se obtiene de *Trichoderma*. La proteína de CBHI de *Trichoderma reesei* es de aproximadamente 65 kDa comprendiendo un dominio de unión a celulosa C-terminal, una región enlazadora y una región de núcleo de CBHI y digiere celulosa desde el extremo reductor liberando celobiosa (Shoemaker, 1983). Sin embargo, ha de entenderse que la proteína de CBHI puede obtenerse también de otras fuentes (Barr y otros, 1996, *Biochemistry* 35:586-592; Birch 1998, *Current Genetics* 33:70-76; Henrissat 1998, *Biochemical society transactions* 21(2):153-156; Henrissat y Bairoch 1996, *Biochem. J.* 316:695-696; Liman y otros, 1995, *Enzyme and Microbial Technology* 17:340.346; Parsieglia y otros, 2000, *Biochemistry* 39:11238-11246; Schulein 1997, *Journal of Biotechnology* 57:71-81; Shen y otros, 1995, *Biochem. J.* 311:67-74; Teeri y otros, 1997, *Biochemical society transactions* 26(2):173-178).

Por “núcleo de CBHI” se entiende la porción de CBHI que comprende el dominio catalítico de CBHI, y que es capaz de hidrolizar un substrato celulósico según se define aquí. Por ejemplo, lo que no ha de considerarse limitativo de ningún modo, el núcleo de CBHI de *Trichoderma* es de aproximadamente 56 kDa. El núcleo de CBHI puede producirse mediante segmentación proteolítica de la proteína de CBHI usando una proteasa adecuada, por ejemplo, pero no limitada a, papaína (por ejemplo, usando el método de van Tillbeurgh y otros, 1986; Offord y otros). De esta manera, una proteasa, por ejemplo, pero no limitada a, papaína, también puede añadirse a una mezcla de enzimas en bruto para producir núcleo de CBHI dentro de la mezcla. En esta modalidad, dependiendo de la proteasa añadida, también pueden producirse otras enzimas nucleares. El núcleo de CBHI también puede producirse usando tecnología recombinante, por ejemplo, usando el método descrito en U.S. 5.874.276. De esta manera, CBHI y núcleo de CBHI pueden coexpresarse en el mismo organismo huésped, o el huésped puede modificarse genéticamente de modo que la expresión de CBHI natural se reduzca o elimine, y complementarse o reemplazarse, respectivamente, con expresión de núcleo de CBHI recombinante. Debe entenderse que el núcleo de CBHI también incluye fragmentos o derivados de núcleo de CBHI, incluyendo sustituciones, deleciones, inserciones dentro de la secuencia del núcleo de CBHI como será conocido por un experto en la técnica, con tal de que estos fragmentos y derivados exhiban actividad de núcleo de CBHI debido a que sean capaces de hidrolizar celulosa. Un ejemplo no limitativo de un núcleo de CBHI derivado es un núcleo de CBHI fosforilado. También debe entenderse que el núcleo de CBHI debe aislarse de un organismo en el que la proteína de CBHI no comprenda un dominio de unión a celulosa o una región enlazadora.

Por el término “núcleo de CBHI más enlazador” se entiende un fragmento de una proteína de CBHI que comprende proteína del núcleo de CBHI y la secuencia de aminoácidos enlazadora, o un fragmento de la misma, que enlaza la proteína del núcleo de CBHI al CBD de la proteína de CBHI. La porción enlazadora del núcleo de CBHI más enlazador puede comprender cualquier longitud de la secuencia de aminoácidos. Además, ha de entenderse que el

núcleo de CBHI más enlazador también incluye fragmentos o derivados de núcleo de CBHI más enlazador, incluyendo sustituciones, deleciones, inserciones dentro de la secuencia del núcleo de CBHI más enlazador, como será conocido por un experto en la técnica, con tal de que estos fragmentos y derivados de núcleo de CBHI más enlazador exhiban actividad del núcleo de CBHI. Un ejemplo no limitativo de un núcleo de CBHI más enlazador derivado es un núcleo de CBHI más enlazador fosforilado. También debe entenderse que el núcleo de CBHI más enlazador puede aislarse de un organismo en el que la proteína de CBHI no comprende un dominio de unión a celulosa.

Por el término “CBHI con dominio de unión a celulosa inactivo” se entiende una proteína que comprende núcleo de CBHI o núcleo de CBHI más enlazador y un dominio de unión a celulosa (CBD) que se ha inactivado. La inactivación de un CBD puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, pero no limitados a, Linder y otros (Linder y otros, 1995, Protein Science, 4; 1056-1064; y Linder y otros, 1999, FEBS Letters 447, 13-16). Un CBD inactivado da como resultado una capacidad reducida del CBD para unirse a celulosa en comparación con la actividad de unión asociada con una CBHI silvestre correspondiente y ensayada bajo condiciones idénticas (por ejemplo, según se descubre en los estudios de unión de Linder y otros, 1999, FEBS Letters 447, 13-16). Además, debe entenderse que la CBHI con dominio de unión a celulosa inactivo también incluye fragmentos o derivados de CBHI incluyendo sustituciones, deleciones, inserciones dentro de la secuencia de CBHI, enlazador, CBD o combinaciones de los mismos, como será conocido para un experto en la técnica, con tal de que estos fragmentos y derivados exhiban actividad del núcleo de CBHI y exhiban una capacidad reducida para unirse a celulosa. Un ejemplo no limitativo de una CBHI derivada con dominio de unión a celulosa inactivo es una CBHI fosforilada con dominio de unión a celulosa inactivo. También ha de entenderse que una CBHI con dominio de unión a celulosa inactivo puede aislarse de un organismo en el que la proteína de CBHI comprende un dominio de unión a celulosa, sin embargo, el CBD exhibe escasa actividad de unión a celulosa. Una CBHI que exhibe escasa actividad de unión a celulosa exhibe menos de aproximadamente 70% de la actividad de unión a celulosa de una CBHI obtenida de *Trichoderma reesei* usando el mismo sustrato. Preferiblemente, la CBHI que exhibe escasa actividad de unión a celulosa exhibe menos de aproximadamente 50% de la actividad de unión a celulosa de CBHI de *Trichoderma reesei*. Se conoce una gama de enzimas CBHI en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, las descritas en Barr y otros, (1996, Biochemistry 35:586-592), Birch (1998, Current Genetics 33:70-76), Henrissat (1998, Biochemical society transactions 21(2):153-156), Henrissat y Bairoch (1996, Biochem. J. 316:695-696), Liman y otros, (1995, Enzyme and Microbial Technology 17:340-346), Parsieglia y otros, (2000, Biochemistry 39:11238-11246), Schulein (1997, Journal of Biotechnology 57:71-81), Shen y otros, (1995, Biochem. J 311:67-74), y Teeri y otros, (1997, Biochemical society transactions 26(2):173-178).

Por “CBHI modificada” se entiende una proteína que comprende núcleo de CBHI, núcleo de CBHI más enlazador, CBHI con dominio de unión a celulosa inactivo o una combinación de los mismos. Una proteína de CBHI modificada se caracteriza por tener actividad de núcleo de CBHI, junto con actividad de unión a celulosa reducida o ausente.

Según se describe con más detalle posteriormente, se ha observado que, sobre varios sustratos lignocelulósicos pretratados, la velocidad de hidrólisis usando una proteína de CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, es equivalente a, o en algunos casos supera, la velocidad de hidrólisis observada usando CBHI. Esto es contrario a informes previos en los que se describe que la CBHI es mucho más rápida que el núcleo de CBHI o la celulosa pura. Sin querer limitarse por una teoría, es posible que las actividades equivalentes entre CBHI y núcleo de CBHI, u otras proteínas de CBHI modificadas, sobre lignocelulosa pretratada, puedan deberse al hecho de que los sustratos lignocelulósicos que se han pretratado tienen una gran superficie específica y esto incrementa el acceso a la proteína de CBHI modificada, tal como la proteína del núcleo de CBHI, para digerir el sustrato. Será apreciado fácilmente por un experto en la técnica que los resultados observados con núcleo de CBHI también pueden obtenerse usando CBHI modificada según se define aquí, que comprende núcleo de CBHI más enlazador, CBHI con dominio de unión a celulosa inactivo o una combinación de los mismos.

Por otra parte, también se ha observado que incrementado la concentración de sustrato de celulosa, la CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, convierte la celulosa más rápidamente (véanse las Figuras 2A y B). Sin querer limitarse por una teoría, una concentración incrementada de sustrato puede reducir los tiempos de migración de la proteína de CBHI modificada dentro de la mezcla de reacción incrementando de ese modo la velocidad de hidrólisis del sustrato.

Los beneficios asociados con el uso de CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, o mezclas de enzimas que comprenden la proteína del núcleo de CBHI, sobre el de solo CBHI, incluyen la capacidad incrementada para recuperar la CBHI modificada de la mezcla de reacción (especialmente cuando se compara con CBHI) después de la digestión (por ejemplo, véase la Tabla 3, el Ejemplo 1 y la Figura 3). Por otra parte, con algunos sustratos, existe una conversión superior o más rápida del sustrato lignocelulósico en glucosa usando CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, en comparación con CBHI, reduciendo de ese modo costes asociados con reintroducir nueva enzima en la mezcla de hidrólisis, y reduciendo la utilización de la enzima. En algunos casos, dependiendo del sustrato celulósico que ha de hidrolizarse, puede ser deseable usar mezclas de CBHI modificada-CBHI, por ejemplo, lo que no debe considerarse limitativo de ningún modo, mezclas de núcleo de CBHI-CBHI, para optimizar la hidrólisis del sustrato (Figuras 1B y C). En estas circunstancias, pueden alcanzarse ahorros de coste debido a la recuperación de la proteína de CBHI modificada y las velocidades de reacción incrementadas, puesto que solo existe una pérdida parcial de enzima añadida y la actividad incrementada permite el uso de menos enzima o tiempos de reacción reducidos.

ES 2 266 265 T3

Para poner en práctica la invención, la hidrólisis enzimática de celulosa se lleva a cabo usando una mezcla de enzimas celulasa. Los expertos en la técnica saben que una mezcla de celulasas eficaz contiene tipo CBHI, tipo CBHII, EG, β -glucosidasa y otras enzimas que se requieren para efectuar toda la gama de reacciones de hidrólisis necesarias. El experto también sabe que el término “tipo CBHI” abarca la enzima holo. La CBHI de *Trichoderma* tiene un peso molecular de aproximadamente 65 Kd, comprendiendo el núcleo de CBHI, el enlazador y las regiones de dominios de unión a celulosa. “Tipo CBHI” también incluye:

- proteína del núcleo de CBHI, por ejemplo en el caso de *Trichoderma*, que tiene un peso molecular de aproximadamente 56 Kd,
- proteína del núcleo de CBHI con enlazador ligado (“núcleo de CBHI más enlazador”), con un peso molecular en el caso de *Trichoderma* de aproximadamente 60 Kd,
- CBHI fosforilada, que tiene, por ejemplo en *Trichoderma*, un peso molecular de aproximadamente 65 Kd,
- CBD (dominio de unión a celulosa) de CBHI aislado,

así como diversas formas de diferentes grados de glicosilación y otras características estructurales que se presentan en pequeñas cantidades. También debe entenderse que la enzima tipo CBHI también puede incluir CBHI modificada según se describe aquí, incluyendo CBHI con dominio de unión a celulosa inactivado.

En el contexto de la presente invención, las enzimas tipo CBHI son preferiblemente al menos 55% de CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitado a, proteína del núcleo de CBHI. La proporción de proteína de CBHI modificada puede ascender a 100% de la enzima tipo CBHI total presente.

La determinación del porcentaje de CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, dentro de las enzimas tipo CBHI se lleva a cabo usando una electroforesis de enfoque isoeléctrico capilar (CIEF). El método de electroforesis CIEF se describe en el Ejemplo 4.

La invención se pone en práctica en un sistema de hidrólisis en el que el índice de eficacia E_I es mayor que 0,5. El índice de eficacia, E_I , que se mide usando los procedimientos del Ejemplo 1, es la relación de la velocidad de hidrólisis de CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, a la de CBHI intacta, donde:

$$E_I = [\text{actividad de CBHI modificada}]/[\text{actividad de CBHI}]$$

La determinación de E_I se realiza a una concentración de sustrato constante y se realiza usando una base comparable de enzima, por ejemplo sobre una base por mg de proteína. Para la determinación de E_I según se describe aquí, se usó una concentración de sustrato de 2% de celulosa y 10 mg de proteína. La presente invención contempla usar sustratos lignocelulósicos caracterizados por tener un E_I de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4,0. Un E_I preferido es de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 2,0. Más preferiblemente, el E_I es de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5.

Según se describe aquí, sobre sustratos lignocelulósicos pretratados, E_I tiene un valor cercano a o incluso que supera la unidad. Esto sugiere que la CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, puede hidrolizar estos materiales tan rápidamente o más rápidamente que la CBHI. Este hallazgo en oposición directa con las enseñanzas de la literatura en las que la velocidad de CBHI es mucho más rápida que la del núcleo de CBHI (por ejemplo, Kim, 1997; Van Tilbeurgh y otros, 1986, Ndetsky y otros, 1994).

En un aspecto de una modalidad de la presente invención, CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, proteína del núcleo de CBHI, se recupera y se reutiliza después de la hidrólisis. Los métodos que pueden usarse para recuperar y reutilizar proteínas solubles son bien conocidos en la técnica y pueden aplicarse a cualquier CBHI modificada, por ejemplo núcleo de CBHI. Estos métodos implican separar el residuo de sólidos insoluble del licor de hidrólisis y enviar el licor de hidrólisis de nuevo hacia sustrato reciente (no hidrolizado). Alternativamente, la enzima puede retirarse del licor de hidrólisis mediante precipitación; por ejemplo, pero no limitada a, precipitación por pH, sal, temperatura; extracción, por ejemplo, pero no limitada a, extracción con disolventes; o filtración, por ejemplo, pero no limitada a, ultrafiltración; y añadirse de nuevo a la hidrólisis. En el caso de la retirada de enzima usando ultrafiltración, una membrana preferida tiene una separación de pesos moleculares de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 20.000. Más preferiblemente, la separación es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para convertir celulosa en glucosa, que comprende tratar un sustrato lignocelulósico pretratado con una mezcla de enzimas que comprende enzima celulasa y una CBHI modificada, en donde la CBHI modificada está presente en la mezcla de enzimas en una cantidad con relación a toda la enzima tipo CBHI de 55 a 100% en peso. Preferiblemente, la cantidad de CBHI modificada en dicha mezcla de enzimas es de 70 a 100% en peso, más preferiblemente, la cantidad de CBHI modificada en la mezcla de enzimas es de 80 a 100% en peso.

ES 2 266 265 T3

También se describe una composición de celulasas que comprende CBHI modificada y una o más de CBHI, CBHII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde la CBHI modificada está presente en la composición de celulasas en una cantidad con relación a toda la enzima tipo CBHI de 55 a 100% en peso. La CBHI modificada puede ser de 70 a 100% en peso y puede ser de 80 a 100% en peso. También se prefiere que la CBHI modificada sea una CBHI de *Trichoderma* modificada.

También se describe un método para convertir celulosa en glucosa, que comprende tratar un substrato lignocelulósico con una mezcla de enzimas que comprende CBHI, o una mezcla que comprende celulosa, y CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, proteína del núcleo de CBHI. Si se usa una mezcla de CBHI y núcleo de CBHI, la cantidad de CBHI o núcleo de CBHI en la mezcla de reacción de enzimas es de 10% a 100% en peso de la proteína de CBHI y núcleo de CBHI (donde CBHI más núcleo de CBHI comprende hasta 100% en peso de las enzimas tipo CBHI; véanse las Figuras 1B y 1C). La cantidad de CBHI o núcleo de CBHI puede ser de 20% a 80% en peso de la proteína de CBHI y núcleo de CBHI dentro de la mezcla de reacción. Por ejemplo, lo que no se considera de ningún modo limitativo, una mezcla de reacción adecuada puede comprender entre 20% en peso de CBHI y 80% en peso de CBHI (de la proteína de CBHI y núcleo de CBHI).

También se describe un método para convertir celulosa en glucosa, que comprende tratar un substrato celulósico con una mezcla de enzimas que comprende CBHI y CBHI modificada, por ejemplo núcleo de CBHI, como las únicas enzimas tipo CBHI, y una o más de otras enzimas celulasa, incluyendo CBHII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde la relación en peso de CBHI o núcleo de CBHI, como un ejemplo de una CBHI modificada, en la mezcla de enzimas está en el intervalo de aproximadamente 10% a aproximadamente 100% en peso del tipo CBHI. La cantidad de CBHI o núcleo de CBHI puede ser de 20% a 80% en peso del tipo CBHI. En este método, el núcleo de CBHI puede añadirse a una mezcla de celulasas (que comprende una o más de CBHI, CBHII, EG I, EG II y β -glucosidasa) producida por, por ejemplo, pero no limitado a, un hongo filamentoso. Preferiblemente, el hongo filamentoso es *Trichoderma*. De forma similar, el núcleo de CBHI puede ser expresado por un huésped capaz de producir una mezcla de enzimas celulasa (que comprende CBHI, CBHII, EG I, EG II y β -glucosidasa).

También se describe una composición de celulasas que comprende una enzima CBHI, por ejemplo obtenida de *Trichoderma*, y una o más de CBHII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde el núcleo de CBHI está presente en la composición de celulasas en una cantidad relativa a toda la enzima tipo CBHI de 15 a 100% en peso. El núcleo de CBHI puede ser de 50 a 100% en peso y también puede ser de 80 a 100% en peso.

También se describe aquí una composición de celulasas que comprende CBHI modificada y una o más de enzimas distintas de CBHI, por ejemplo, pero no limitadas a, CBHII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde la CBHI modificada está presente en la composición de celulasas en de 50 a 90% en peso con relación a otras enzimas celulasa como será conocido para un experto en la técnica. Otras enzimas celulasa pueden incluir enzimas naturales además de las enzimas listadas anteriormente, por ejemplo, pero no limitadas a, EG III o derivados de enzimas celulasa naturales que exhiben actividad de celulasa, incluyendo, pero no limitadas a, CBHII, EG I, EG II, EG III o β -glucosidasa. La CBHI modificada puede ser una CBHI de *Trichoderma* modificada.

También se contempla mediante un aspecto de una modalidad de la invención proporcionar un método para convertir celulosa en glucosa usando una mezcla de enzimas que comprende CBHI y una CBHI modificada, por ejemplo núcleo de CBHI más enlazador, y una o más de otras enzimas celulasa, incluyendo CBHII, EG I, EG II y β -glucosidasa, en donde la relación en peso de núcleo de CBHI más enlazador en la mezcla de enzimas es de 50% a 100% de las enzimas tipo CBHI. Preferiblemente, la cantidad de núcleo de CBHI más enlazador es de 70% a 100% en peso de las enzimas tipo CBHI. Más preferiblemente, la cantidad de núcleo de CBHI más enlazador es de 80% a 100% en peso del peso de enzimas tipo CBHI.

También se contempla por un aspecto de una modalidad de la presente invención un método para convertir celulosa en glucosa usando una mezcla de enzimas que comprende CBHI con un dominio de unión a celulosa inactivo. La inactivación del CBD de CBHI puede efectuarse usando cualquier método adecuado como será conocido dentro de la técnica, por ejemplo, pero no limitado a Linder y otros (1995, citado anteriormente) o Linder y otros (1999, citado anteriormente). Estas referencias describen cambios en aminoácidos sencillos dentro del CBD de CBHI que dan como resultado la pérdida parcial o completa de la capacidad para que el CBD se una a celulosa. Otros métodos para la inactivación del CBD pueden incluir la delección de una porción del CBD o la inserción de una secuencia peptídica dentro del CBD para interrumpir la actividad de unión de CBD.

Los expertos en la técnica saben que la hidrólisis de celulosa puede producirse bajo una variedad de condiciones. Preferiblemente, la hidrólisis de celulosa se realiza mediante enzimas celulasa en una suspensión de agua y celulasa que comprende de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 15% de celulosa a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 y a una temperatura de aproximadamente 50°C. Esas condiciones son adecuadas para la mayoría de las enzimas celulasa. Sin embargo, la presente invención también contempla hidrolizar celulosa bajo otras condiciones que pueden ser más adecuadas para una mezcla particular de celulasa/núcleo de CBHI, CBHI-núcleo de CBHI u otras que comprenden CBHI modificada según se define aquí. Tales condiciones pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica.

Puede usarse cualquier fuente del sistema de enzimas celulasa de acuerdo con el método de la presente invención. Preferiblemente, las enzimas celulasa son de *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma reesei*, o una combinación

ES 2 266 265 T3

de las mismas. Por otra parte, las proteínas de CBHI y CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, también se obtienen preferiblemente de *T. longibrachiatum* y *T. reesei*, o una combinación de las mismas.

Las enzimas celulasa de *Trichoderma* en bruto usadas como una base para el método de la presente invención pueden obtenerse directamente a través de cultivo del microorganismo apropiado, o las enzimas pueden adquirirse comercialmente (por ejemplo de Iogen Corporation). El núcleo de CBHI puede obtenerse expresando la secuencia genética apropiada en una célula huésped adecuada, como se realiza comúnmente en la técnica y según se describe en US 5.874.276, o el núcleo de CBHI puede prepararse mediante segmentación enzimática de CBHI según se describe anteriormente. De forma similar, puede obtenerse CBHI más enlazador expresando una secuencia de nucleótidos que comprende el núcleo de CBHI y la región enlazadora, o a través de segmentación proteolítica de la holoenzima. CBHI dentro del dominio de unión a celulosa inactivo puede obtenerse como se describe anteriormente, expresando la secuencia genética apropiada que codifica un CBD inactivo a través de sustitución, delección o inserción, o como es conocido por un experto en la técnica.

El experto apreciará que la cantidad de enzima celulasa que ha de usarse en la hidrólisis de celulosa en glucosa puede estar determinada por la naturaleza del substrato celulósico, el procedimiento de pretratamiento, el coste de las enzimas, el tiempo de hidrólisis deseado y el rendimiento de glucosa deseado a partir del substrato en celulosa. Un intervalo de dosificación de enzimas típico es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 unidades de papel de filtro (FPU) de celulasa por gramo de celulosa durante un período de tiempo de aproximadamente 3 a aproximadamente 200 horas. En una modalidad preferida, la dosificación de enzima celulasa es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 FPU por gramo de celulosa.

El experto sabe que la concentración de celulosa se elige para ajustarse a las capacidades de las bombas para manejar y mezclar los sólidos. Dependiendo del material, se usa una concentración de celulosa de aproximadamente 1% a aproximadamente 25%. Sin embargo, según se describe aquí, se ha observado que concentraciones de celulosa superiores favorecen la hidrólisis usando CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI (véase el Ejemplo 3). Una concentración preferida de celulosa dentro de la mezcla de reacción es de aproximadamente 10% a aproximadamente 16%. Una concentración de celulosa más preferida es de aproximadamente 12% a aproximadamente 16%.

La Figura 1 muestra el porcentaje de conversión de celulosa en glucosa para un substrato lignocelulósico pretratado, en este caso, tallos de maíz lavados pretratados, usando diversas cantidades de proteína de CBHI o núcleo de CBHI. El porcentaje de conversión de substrato lignocelulósico pretratado después de una reacción de tres horas es mayor con proteína de núcleo de CBHI que con la enzima CBHI a concentraciones de enzima entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de enzima por gramo de celulosa. También se han observado resultados similares para otros substratos lignocelulósicos pretratados, incluyendo, pero no limitados a, cáscaras de avena, tallos de maíz y paja de trigo (resultados resumidos en la Figura 3).

También se examinó el efecto de incrementar la concentración de substrato celulósico en la mezcla de reacción, y una muestra de los resultados, usando SIGMACELL™ o madera de angiospermas pretratada, se presentan en las Figuras 2A, B y C. En general, se observó la conversión incrementada de celulosa en glucosa mediante CBHI, con una concentración incrementada del substrato celulósico. Como se muestra en la Figura 2C, la actividad de CBHI típicamente supera la del núcleo de CBHI (relación de núcleo de CBHI:CBHI <1) a concentraciones bajas de substrato, sin embargo, a concentraciones superiores de substrato, la actividad del núcleo de CBHI supera la de CBHI. Estos datos también sugieren que se observa actividad del núcleo de CBHI incrementada (con relación a la actividad de CBHI) a diferentes concentraciones de substrato dependiendo del substrato usado. Sin embargo, con todos los substratos probados, un incremento en la concentración de substrato daba como resultado un incremento en la conversión de substrato usando núcleo de CBHI. En el caso de SIGMACELL™, la actividad del núcleo de CBHI supera la actividad de la holoenzima a de aproximadamente 6 a aproximadamente 7% en peso de concentración de substrato, mientras que sobre madera de angiospermas pretratada este umbral se alcanza a aproximadamente 3% en peso de celulosa. Sin embargo, debe entenderse que aun cuando la actividad del núcleo supere la actividad de la holoenzima a una cierta concentración de substrato dependiendo el substrato, la proteína del núcleo todavía se activa en soluciones de celulosa más diluidas con un substrato lignocelulósico pretratado. Por lo tanto, el núcleo de CBHI todavía puede usarse eficazmente a concentraciones de substrato inferiores, si se desea. La consideración de la cantidad de núcleo de CBHI y substrato que ha de usarse dependerá de diversas variables de la mezcla de reacción incluyendo el tiempo de reacción, la temperatura de reacción, el substrato celulósico que ha de hidrolizarse, etc., como será conocido para un experto en la técnica.

El análisis de la adsorción de CBHI o núcleo de CBHI a diferentes substratos celulósicos (véase la Tabla 3, Ejemplo 1) indica que para la mayoría de los substratos, el núcleo de CBHI puede recuperarse eficazmente, mientras que la CBHI es retenida más fácilmente por el substrato. La cantidad de núcleo de CBHI recuperable de una mezcla de reacción puede expresarse como un "índice de recuperabilidad" o "R₁", donde R₁ es una medida de la proteína, en este caso CBHI más núcleo de CBHI, en solución como una función de la proteína, es decir CBHI más núcleo de CBHI, total añadida inicialmente:

$$R_1 = [\text{cantidad de proteína en solución}]/[\text{proteína total añadida inicialmente}] \times 100$$

ES 2 266 265 T3

La determinación de R_1 se realiza a una concentración de sustrato constante, por ejemplo, según se describe aquí, a 2% de celulosa. Usando madera de angiospermas (por ejemplo, álamo) pretratada como el sustrato lincocelulósico, a una concentración de 2% de celulosa, se observa un R_1 de 96 en mezclas de reacción que comprenden 110% de núcleo de CBHI. Esto indica que aproximadamente 96% de la enzima añadida es recuperable de la mezcla de reacción. En mezclas que comprenden 50% de núcleo de CBHI y 50% de CBHI, el R_1 es aproximadamente 60, mientras que en mezclas que comprenden 100% de CBHI, el R_1 es aproximadamente 24. Estos datos están de acuerdo con informes previos de que la CBHI se une a celulosa preferentemente y no se retira fácilmente del sustrato.

Los resultados presentados en las Figuras 1 a 4 demuestran que una variedad de sustratos celulósicos pretratados, preferiblemente sustratos lincocelulósicos, es muy adecuada para la hidrólisis usando proteína de núcleo de CBHI. En varios casos y bajo ciertas circunstancias, la velocidad absoluta de hidrólisis es superior usando núcleo de CBHI en comparación con CBHI, aun cuando la cantidad de núcleo de CBHI unido al sustrato en cualquier momento dado sea baja, a menudo menor que aproximadamente 10% (véase la Figura 3, donde $R_1 > 90$).

Por lo tanto, esta invención se dirige a la hidrólisis de sustratos celulósicos usando una CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, una proteína de núcleo de CBHI, que se caracteriza por tener una baja tendencia a unirse a sustratos celulósicos, pero que todavía exhibe alta actividad.

También se describe un método para la hidrólisis de un sustrato celulósico, que comprende añadir una cantidad suficiente de CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleos de CBHI, a una mezcla de enzimas celulasa y dejar que la reacción avance durante un período de tiempo suficiente para hidrolizar la celulosa en glucosa.

También se describe un método para la hidrólisis de un sustrato celulósico usando mezclas de proteínas de CBHI y núcleo de CBHI, a lo largo de un intervalo de mezcla de aproximadamente 20% en peso de núcleo de CBHI y aproximadamente 80% en peso de CBHI a aproximadamente 100% en peso de núcleo de CBHI.

Con referencia a la Figura 1A, se muestra el porcentaje de conversión de celulosa en glucosa a partir de tallos de maíz lavados 3 horas después de la incubación con proteína de CBHI o núcleo de CBHI. Existe un incremento en la conversión de celulosa en glucosa con la dosificación creciente de CBHI y núcleo de CBHI. A todas las dosificaciones, el núcleo de CBHI alcanza una conversión superior que la CBHI.

En referencia ahora a las Figuras 1B y 1C, se muestra el porcentaje de conversión de celulosa en glucosa a partir de cáscaras de avena y madera de angiospermas pretratadas, respectivamente, después de tres horas de incubación en presencia de diversas combinaciones de proteína de CBHI-núcleo de CBHI. La mayor conversión de celulosa en glucosa se observa para una mezcla de proteína de CBHI y núcleo de CBHI que comprende aproximadamente 20% en peso de CBHI y aproximadamente 80% en peso de proteína de núcleo de CBHI a aproximadamente 80% en peso de CBHI y aproximadamente 20% en peso de núcleo de CBHI.

Los resultados para la hidrólisis de celulosa usando CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, o mezclas de proteína de CBHI y núcleo de CBHI, descritas anteriormente, se determinaron, a no ser que se indique otra cosa, en ensayos que comprenden 2% de celulosa como un sustrato. También se han obtenido resultados que demuestran la eficacia de usar núcleo de CBHI usando concentraciones de celulosa de hasta aproximadamente 8% en peso, con propósitos agrícolas, o hasta aproximadamente 12%, para madera de angiospermas pretratada (por ejemplo, véanse las Figuras 2A, B y C). Así, la presente invención contempla usar CBHI modificada sola, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, o mezclas de proteína de CBHI y CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, para convertir celulosa en glucosa en mezclas en las que la mezcla de celulosa inicial puede comprender de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 15% en peso de celulosa. Preferiblemente, la concentración de celulosa es de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 12% en peso. Más preferiblemente, el sustrato lincocelulósico correspondiente, que es aproximadamente 50% de celulosa, está presente en la mezcla de enzimas en una concentración de aproximadamente 2% en peso a aproximadamente 25% en peso.

Con referencia a la Figura 3, se muestra un resumen de las actividades de CBHI y CBHI modificada, en este ejemplo núcleo de CBHI, sobre diferentes sustratos lincocelulósicos, y la recuperabilidad de estas proteínas a partir de estos sustratos. La Figura 3 compara valores de R_1 y E_1 para una gama de diferentes sustratos. Pueden identificarse tres clases de sustratos a partir de los datos presentados en la Figura 3:

- 1) una clase de sustrato caracterizada por tener un R_1 bajo y un E_1 bajo (situado en el cuadrante izquierdo inferior de la gráfica; "sustrato clase uno"). Un ejemplo de tal sustrato es Sigmacell™ con un R_1 de aproximadamente 36 y un E_1 de aproximadamente 0,1, que demuestra que la velocidad de CBHI es mucho mayor que la del núcleo de CBHI, y que la recuperabilidad del núcleo de CBHI es baja;
- 2) una clase de sustrato caracterizada por tener un R_1 intermedio, de entre aproximadamente 45 y 75, y un E_1 mayor que aproximadamente 0,75 (clase situada en el intervalo medio de la gráfica, "sustrato clase dos"). Ejemplos de estos sustratos incluyen paja de trigo con un R_1 de aproximadamente 64 y un E_1 de aproximadamente 1,1, que demuestran que la velocidad del núcleo de CBHI es aproximadamente equivalente a la de CBHI, y que la recuperabilidad del núcleo de CBHI es mayor que aproximadamente 50%; y

- 3) una tercera clase de sustratos caracterizada por tener un R_1 mayor que 75 y un E_1 mayor que 1 (“clase de sustrato tres”). Ejemplos de esta clase de sustratos incluyen cáscaras de avena (un R_1 de aproximadamente 98 y un E_1 de aproximadamente 0,75), paja de maíz (un R_1 de aproximadamente 98 y un E_1 de aproximadamente 1,1), H60 (un R_1 de aproximadamente 96 y un E_1 de aproximadamente 1,1) y Solka-floc (un R_1 de aproximadamente 97 y un E_1 de aproximadamente 3,3).

En referencia ahora a la Figura 4, se muestran resultados obtenidos a partir de la hidrólisis de cáscaras de avena pretratadas mediante mezclas de celulasas que comprenden CBHI o CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI. La mezcla de celulasas que comprende CBHI modificada exhibe resultados similares a mezclas que comprenden CBHI, sugiriendo que la CBHI modificada es eficaz para hidrolizar mezclas de celulasas. Además, la CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, puede recuperarse más fácilmente que la CBHI, y este atributo puede ser ventajoso en la hidrólisis de celulosa.

Por lo tanto, también se describe un método para la hidrólisis de un sustrato lignocelulósico, usando CBHI modificada, por ejemplo, pero no limitada a, núcleo de CBHI, o mezclas de CBHI modificada-CBHI, donde el sustrato se caracteriza por ser un sustrato de clase dos o tres. Por otra parte, este método se dirige a un método de hidrólisis lignocelulósica en la que el sustrato se caracteriza por tener un E_1 de al menos aproximadamente 0,75 y un R_1 de al menos aproximadamente 45 a aproximadamente 100. El sustrato puede caracterizarse por tener un E_1 de más de aproximadamente 1,0 y un R_1 de más de aproximadamente 70. Alternativamente, el E_1 puede ser de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0 y el R_1 puede ser de aproximadamente 60 a aproximadamente 100.

También se describe un método para la hidrólisis de un sustrato lignocelulósico en el que el sustrato se caracteriza por tener un R_1 de aproximadamente 45 a aproximadamente 98. El R_1 puede ser de aproximadamente 60 a aproximadamente 98. Alternativamente, el R_1 puede ser de aproximadamente 80 a aproximadamente 98.

La presente invención también abarca un método para la hidrólisis de un sustrato lignocelulósico, en el que el sustrato se caracteriza por tener un E_1 de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 4,0. Preferiblemente, el E_1 es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 4,0. Más preferiblemente, el E_1 es de aproximadamente 1 a aproximadamente 3,6.

La descripción anterior no pretende limitar la invención reivindicada de ningún modo. Por otra parte, la combinación de características analizada podría no ser absolutamente necesaria para la resolución de la invención.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, ha de entenderse que estos ejemplos tienen solamente propósitos ilustrativos y no deben usarse para limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Ejemplo 1

Hidrólisis de materiales celulósicos mediante CBHI y núcleo de CBHI y determinación de E_1

Los sustratos usados se listan en la Tabla 1 y las enzimas se prepararon como sigue:

TABLA 1
Sustratos de Celulosa

| Substrato | Celulosa (%) | Fuente |
|-------------------------------|--------------|--------------------------|
| SigmaCell | 100 | Sigma Chemical Co. |
| Solka floc | 92 | Fibre Sales & Dev. Corp. |
| Paja de trigo pretratada | 45 | Iogen* |
| Tallos de maíz pretratados | 55 | Iogen* |
| Álamo pretratado | 53 | Iogen* |
| Cáscaras de avena pretratadas | 55 | Iogen* |

* como para US 4.461.648; el procedimiento de pretratamiento implicaba añadir ácido sulfúrico de aproximadamente 0 a aproximadamente 5% a un sustrato lignocelulósico, y la mezcla acidificada se hervía durante de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 minutos a una temperatura de aproximadamente 180 a aproximadamente 250°C.

Se obtuvo CBHI purificada de un caldo de celulosa de *Trichoderma* en bruto filtrando en primer lugar el caldo a través de papel de filtro de microfibras de vidrio. El líquido de celulosa se dializó a continuación usando una membrana de separación de peso molecular 10.000 para disminuir su conductividad hasta 12.000 μ S. La CBHI se enriqueció cargando 190 mg de proteína/ml de resina sobre resina de intercambio iónico de DEAE-Sepharose de pH 6. Los otros

ES 2 266 265 T3

componentes se desorbieron de la resina antes del CBHI, haciendo pasar fosfato 50 mM, tampón de NaCl 25 mM a una conductividad de 9.000 μS a través de la columna. La CBHI se desorbió haciendo pasar tampón de fosfato 50 mM, NaCl 300 mM a una conductividad de 30.000 μS a través de la columna. La CBHI se concentró a continuación mediante ultrafiltración y su pureza se determinó mediante una unidad de electroforesis de enfoque isoeléctrico LKB Bromma.

La proteína del núcleo de CBHI se obtuvo de CBHI mediante una digestión con papaína Quest del componente puro a una dosificación de 0,05 g de papaína/g de proteína durante 2 días. El pH y la temperatura del digesto eran 4,5 y 37°C, respectivamente. El digesto se filtró a continuación a través de papel de filtro de microfibras de vidrio. La pureza de la CBHI se determina a continuación mediante una unidad de electroforesis de enfoque isoeléctrico LKB Bromma.

Las mezclas de hidrólisis pesaban un total de 10 gramos. La cantidad de sustrato añadida era tal que estaban presentes 0,2 gramos de celulosa. Además, se añadió tensioactivo Neodox 23-6 (4 mg/gramo de celulosa), junto con 80 UI de beta-glucosidasa Novozyme 188, que tiene una actividad de reserva de 1444 unidades por mililitro. El tensioactivo y la beta-glucosidasa controlan la espumación y la formación de celobiosa, respectivamente. La mezcla se llevó hasta un total de 10 gramos (excluyendo CBHI o núcleo de CBHI) con tampón de citrato sódico 50 mM, pH 4,8. La dosificación de CBHI o núcleo de CBHI era 10 mg de proteína por gramo de celulosa.

Las mezclas se incubaron a 50°C con remoción a 250 RPM durante 3 horas. En este momento, se tomó una muestra de la mezcla y se filtró a través de papel de filtro de microfibras de vidrio. La concentración de glucosa en la muestra se midió mediante el Analizador de Glucosa YSI de Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio. La concentración de glucosa se expresa como un porcentaje de conversión de la celulosa en el sustrato. Los resultados de incubar los sustratos de la Tabla 1 con las enzimas obtenidas anteriormente se listan en la Tabla 2.

TABLA 2

Conversión de sustratos de celulosa usando proteína de CBHI o núcleo de CBHI

| Substrato | Conversión (%) después de 3 h de hidrólisis | | E_1 |
|---------------------------------------|---|------|-------|
| | Núcleo de CHBI | CBHI | |
| SigmaCell | 1,9 | 4,5 | 0,42 |
| Kim y otros (1997) | | | 0,14* |
| Van Tilbeurgh y otros (1986) | | | 0,01* |
| Nidetsky y otros (Filter paper; 1994) | | | 0,44* |
| Tallos de algodón | 14,8 | 13,6 | 1,09 |
| Solka floc | 10,0 | 2,9 | 3,45 |
| Álamo | 6,9 | 7,2 | 0,96 |
| Cáscaras e avena | 7,4 | 9,2 | 0,80 |
| Paja de trigo | 9,8 | 9,2 | 1,07 |

* estimado de velocidades de actividad presentadas de CBHI y núcleo de CBHI

El índice de eficacia E_1 es la relación de conversión de núcleo de CBHI a CBHI bajo las condiciones usadas en este ejemplo. A $E_1 = 0$, el núcleo de CBHI es completamente incapaz de hidrolizar un sustrato, a E_1 entre 0 y la unidad, la velocidad del núcleo de CBHI es inferior que la velocidad de la CBHI. A $E_1 = 1$, la velocidad del núcleo de CBHI es igual que la de CBHI. A $E_1 > 1$, el núcleo de CBHI es más rápido que la CBHI.

Para SigmaCell, la E_1 es 0,42 (véase la Figura 3). Esto está de acuerdo con los resultados de Van Tilbeurgh y otros (1986), Kim y otros (1997) y Nidetsky y otros (1994), todos los cuales presentaron velocidades de hidrólisis mucho más lentas mediante núcleo de CBHI que mediante CBHI que corresponden a relaciones bajas de actividad del núcleo de CBHI:actividad de CBHI. Esto es similar a una E_1 baja, aunque los procedimientos no son iguales que los usados para la determinación de E_1 .

Sorprendentemente, sobre los otros sustratos, E_1 está entre 0,8 y 1,09, excepto Solka floc, que se hidrolizaba con un E_1 de más de 3 (Figura 3).

La cantidad de proteína en solución se midió para varios de los sustratos, después de 3 horas de hidrólisis. Esta medida se realizó mediante un ensayo de proteínas Biorad usando celulasas Iiogen (90 g/l) como un patrón. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Recuperación de proteína de la solución después de la hidrólisis

| 5 | Substrato | Proteína en solución (%) | |
|----|-------------------|--------------------------|----------------|
| | | CBHI | Núcleo de CBHI |
| | Tallos de maíz | 56 | 98 |
| 10 | Cáscaras de avena | 51 | 97 |
| | Solka floc | 44 | 99 |
| | Álamo | 24 | 96 |

15 La cantidad de núcleo de CBHI en solución es muy alta, muy por encima de 90% de la proteína total. La cantidad de CBHI en solución es mucho menor. Por lo tanto, el núcleo de CBHI ofrece la oportunidad de recuperarse y reutilizarse, con una velocidad de hidrólisis virtualmente tan rápida como la CBHI.

20 Ejemplo 2

Hidrólisis de álamo pretratado mediante combinaciones de CBHI y núcleo de CBHI

Se repitieron los procedimientos del Ejemplo 1, excepto que el núcleo de CBHI y la CBHI se usaron en mezclas. Las combinaciones de CBHI/núcleo de CBHI eran 0/100, 20/80, 40/60, 60/40, 80/20 y 100/0, como un porcentaje de proteína total. La proteína total era 10 mg por gramo de celulosa.

30 Los resultados para cáscaras de avena pretratadas como un sustrato se muestran en la Figura 1B, y para madera de angiospermas (álamo) pretratada se presentan en la Figura 1C. Sorprendentemente, las combinaciones de CBHI/núcleo de CBHI de 20/80, 40/60, 60/40 y 80/20 superan a la CBHI sola (100/0). Esto sugiere que existe una sinergia entre CBHI y núcleo de CBHI. La mezcla óptima, aproximadamente 50/50, es 20% más eficaz que la propia CBHI.

Ejemplo 3

Hidrólisis a diversas concentraciones de celulosa

35 Se repitieron los procedimientos del Ejemplo 1, excepto que la concentración de celulosa era 0,5%, 2%, 5% y 10%.

40 Los resultados se muestran en la Figura 2. A medida que la concentración de celulosa se incrementa, los valores de E_i se incrementan sobre SigmaCell (Figura 2A) y álamo (Figura 2B). La alta concentración de celulosa favorece al núcleo de CBHI en la hidrólisis (Figura 2C).

Ejemplo 4

Método para la determinación de proteínas de CBHI modificadas como un porcentaje de toda la enzima tipo CBHI

45 Se usó un instrumento de electroforesis capilar Beckman MDQ de PAGE en el modo de enfoque isoeléctrico capilar (CIEF) para determinar la cantidad de núcleo de CBHI, núcleo de CBHI más enlazador, CBHI fosforilada y oloenzima en una muestra de CBHI obtenida de *Trichoderma*. CIEF es un procedimiento en dos etapas que implica 1) enfoque y 2) movilización. Una muestra de 10 μ l de proteínas al 10% se mezcla con 200 μ l de anfolito neutro y se inyecta en un capilar. Se crea un gradiente de pH (de pH 3-10) mediante los anfolitos bajo la influencia de un campo eléctrico. Las proteínas migran en la dirección opuesta a su carga hasta que alcanzan un estado neutro cuando se enfocan. Esto es seguido por una movilización a baja presión (a 0,8 psi [0,06 kg/cm²]) de las proteínas cuando se explora mediante un detector UV a 280 nm. Se genera un electroferograma que muestra picos correspondientes a lecturas de absorbancia a tiempos de migración particulares. Usando patrones de proteínas, los diferentes picos pueden identificarse de acuerdo con valores de pI conocidos.

60 Bajo estas condiciones, la CBHI de *Trichoderma* exhibe un tiempo de migración típico de aproximadamente 22,1 min, el núcleo de CBHI más enlazador de *Trichoderma* un tiempo de migración de aproximadamente 22,5 minutos, el núcleo de CBHI de *Trichoderma* un tiempo de migración de aproximadamente 24,7 minutos y la CBHI fosforilada de *Trichoderma* de aproximadamente 23 minutos. Estos tiempos de migración pueden variar en aproximadamente ± 2 minutos y habitualmente se comprueban usando patrones. La concentración de las proteínas se determina a partir del área de los picos correspondientes a las proteínas, por ejemplo según se indica en la Tabla 4.

65

ES 2 266 265 T3

TABLA 4

Composiciones de componentes de CBHI de Trichoderma en enzimas celulasa de la técnica anterior

| Celulasa | Tipo CBHI total (%) | % | % | % | % |
|----------------|---------------------|------|----------------|------------------------------|------------------|
| Celulasa Iogen | | CBHI | Núcleo de CBHI | Núcleo de CBHI más enlazador | CBHI fosforilada |
| 240-226 | 74,5 | 70 | 4,7 | 19,4 | 5,8 |
| 230-812 | 74,5 | 36,7 | 11,9 | 39 | 12,4 |
| 230-799 | 70,3 | 56,7 | 9,4 | 22,9 | 11 |
| 230-685 | 70,8 | 73,1 | 6,3 | 16,3 | 4,4 |
| 230-330 | 72,4 | 65,2 | 7 | 24 | 3,7 |

Ejemplo 5

25 *Hidrólisis de cáscaras de avena pretratadas mediante mezclas de celulasas que comprenden núcleo de CBHI*

Se suspendieron muestras de 0,226 gramos de cáscaras de avena pretratadas con vapor de agua (base en seco) en tampón de citrato sódico 50 mM más benzoato sódico al 0,5%, pH 5,0, hasta un peso total de 2,5 gramos en tubos de centrífuga de 15 ml. La suspensión constituía 5% de celulosa. A un grupo de tubos se añade una mezcla de núcleo de CBHI junto con CBHI, EGI y beta-glucosidasa. Las cantidades relativas de CBHI/CBHII/EGI son 60%/20%/20%, respectivamente. Además, se añade beta-glucosidasa Novozym 188 a una concentración de 125 unidades BG por gramo de celulosa. Para un segundo grupo de tubos, el núcleo de CBHI se reemplaza por CBHI, con el resto de la mezcla inalterado. Las dosificaciones de enzimas totales están entre 12 y 95 mg por gramo de celulosa, excluyendo la beta-glucosidasa. Los matraces se incuban a 50°C y se remueven durante 24 horas. En este momento, se toman muestras y se analizan con respecto a la concentración de celulosa residual. La concentración de celulosa se determina centrifugando la suspensión, lavando con agua y suspendiendo en ácido sulfúrico al 82% para obtener una concentración de ácido sulfúrico puro de 70%. La suspensión se incubaba a 40°C durante 30 minutos, seguido por dilución en agua desionizada hasta ácido sulfúrico al 2%. En este punto temporal, las muestras se tratan en autoclave al vapor de agua a 125°C durante 1 hora, para convertir los oligómeros en glucosa monómera. La concentración de glucosa se mide y se compara con la concentración de celulosa inicial para determinar el porcentaje de conversión de celulosa.

Los resultados obtenidos de la hidrólisis de cáscaras de avena pretratadas mediante mezclas de celulasas que comprenden núcleo de CBHI se muestran en la Figura 4. La mezcla de celulasas que comprende núcleo de CBHI exhibe los mismos resultados que mezclas que comprenden CBHI, demostrando que el núcleo de CBHI es eficaz para hidrolizar celulosa usando mezclas de celulasas. Además, como el núcleo de CBHI, o cualquier otra enzima CBHI modificada, puede recuperarse después de la hidrólisis de celulosa, la CBHI modificada puede reciclarse y reutilizarse reduciendo los costes asociados con la producción de glucosa.

La presente invención se ha descrito con respecto a modalidades preferidas, sin embargo, será obvio para los expertos en la técnica que puede realizarse un número de variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención según se describe aquí.

Referencias

55 **Beldman** y otros (1987) *Biotechnol. Bioeng.* 30, 251-257.

Fan y otros, Evaluation Of Pretreatments For. Enzymatic Conversion Of Agricultural Residues, Proceedings of the Third Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, (Gatlinburg, Tennessee, 12-15 de Mayo de 1981).

60 **Foody** y otros, Final Report, Optimization of Steam Explosion Pretreatment U.S. Department of Energy Report ET230501 (Abril de 1980).

Gilkes y otros(1992) *J. Biol. Chem* 267, 6743-6749.

65 **Grethlein** y **Converse** (1991) *Bioresource Technology* 36(2):77-82.

ES 2 266 265 T3

Grohmann y otros, Optimization of Dilute Acid Pretreatment of Biomass, Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (Gatlinburg, Tennessee, 14-17 de Mayo de 1985).

Kim y otros (1997) *Biotechnology Letters*. Vol 19 No 9, 893-897.

Knappert y otros, A Partial Acid Hydrolysis of Cellulosic Materials as a Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis, *Biotechnology and Bioengineering* 23:1449-1463 (1980).

Kotiranta y otros (1999) *Applied Biochemistry and Biotechnology* 81, 81-90.

Kyriacou y otros (1989) *Biotechnol. Bioeng.* 33, 631-637.

Linder y otros (1995) *Protein Science* 4:1056-1064.

Linder y otros (1999) *FEBS Letters* 447:13-16.

Neiditsky y otros, (1994) *Biochem. J.* 303, 817-823.

Penttila, M. y otros (1986) *Gene* 45, 253-263.

Saloheimo, M y otros, (1988) *Gene* 63, 11-21.

Saloheimo y otros (1993) en Proceedings of the second Tricel symposium of *Trichoderma reesei* Cellulases and other hydrolases, Espoo, Finlandia y por P. Suominen y T. Reinikainen. *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research* 8: 139-146.

Schulein, M. (1988) *Methods in Enzymology* 160, 235-242.

Shoemaker y otros (1983) *Bio/Technology* 1, 691-696;

Teeri y otros (1992) *J. Biotechnology* 24, 169-176.

Teeri y otros (1987) *Gene* 51, 43-52.

Teeri, T.T. y **Koivuval** A. (1995) *Carbohydr. Eur.* 12, 28.

Tomme y otros (1988) *Eur. J. Biochem* 170, 570-581.

Van **Tilbeurgh** y otros (1986) *FEBS* 204, 223-227.

ES 2 266 265 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para convertir celulosa en glucosa, que comprende tratar un sustrato lignocelulósico pretratado con una mezcla de enzimas que comprende:
- una CBHI modificada, seleccionada del grupo que consiste en núcleo de CBHI, núcleo de CBHI más enlazador, CBHI con dominio de unión a celulosa inactivado y combinaciones de los mismos; y
- 10 enzimas celulasa, seleccionadas del grupo que consiste en endoglucanasas (EG), exo-celobiohidrolasas (CBH), β -glucosidasas y combinaciones de las mismas,
- dicha CBHI modificada presente en dicha mezcla de enzimas en de 55 a 100% en peso, con relación a todas las enzimas tipo CBHI, en donde dicho sustrato lignocelulósico pretratado comprende al menos 10% de lignina.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la celulosa en el sustrato lignocelulósico pretratado está presente en la etapa de tratamiento a una concentración de 1% en peso a 25% en peso.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la celulosa en el sustrato lignocelulósico pretratado está presente en la etapa de tratamiento en una concentración de 10% en peso a 16% en peso.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha CBHI modificada es una CBHI de *Trichoderma* modificada.
5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha CBHI modificada se recupera después de dicha etapa de tratamiento.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha CBHI modificada se reutiliza después de dicha etapa de recuperación.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha etapa de recuperación comprende usar una membrana de ultrafiltración.
8. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho sustrato lignocelulósico pretratado se selecciona del grupo que consiste en residuos agrícolas, residuos resultantes de la retirada de almidón o azúcar, cultivos para etanol especializados, productos forestales y productos de pasta papelera y papel o combinaciones de los mismos.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que:
- 40 dichos residuos agrícolas se seleccionan del grupo que consiste en tallos de maíz, paja de trigo, paja de cebada y tallos de soja;
- dichos residuos resultantes de la retirada de almidón o azúcar se seleccionan del grupo que consiste en cáscaras de avena, cáscaras de arroz, bagazo de caña de azúcar y fibra de maíz;
- 45 dichos cultivos para etanol especializados se seleccionan del grupo que consiste en mijo perenne, miscantus, espartina y ballico;
- 50 dichos productos forestales se seleccionan del grupo que consiste en madera de angiospermas, madera de coníferas, eucalipto y serrín, y
- dichos productos de pasta papelera y papel son Solka floc.
- 55 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de enzimas comprende CBHI modificada y enzimas celulasa seleccionadas del grupo que consiste en CBHI, CBHII, EG I, EG II, β -glucosidasa y combinaciones de las mismas.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha CBHI modificada es una CBHI de *Trichoderma* modificada.
- 60 12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que dicha CBHI modificada se recupera después de dicha etapa de tratamiento.
- 65 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha CBHI modificada se reutiliza después de dicha etapa de recuperación.

ES 2 266 265 T3

14. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la CBHI modificada es CBHI con un dominio de unión a celulosa inactivo.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha CBHI modificada es núcleo de CBHI.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho núcleo de CBHI se obtiene de CBHI de *Trichoderma*.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha CBHI modificada es núcleo de CBHI más enlazador.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho núcleo de CBHI más enlazador se obtiene de CBHI de *Trichoderma*.

19. Un método para convertir celulosa en glucosa, que comprende tratar un substrato lignocelulósico pretratado con una mezcla de enzimas que comprende:

CBHI modificada, seleccionada del grupo que consiste en núcleo de CBHI, núcleo de CBHI más enlazador, CBHI con dominio de unión a celulosa inactivado y combinaciones de los mismos; y

enzimas celulasa, seleccionadas del grupo que consiste en endoglucanasas (EG), exo-celobiohidrolasas (CBH), β -glucosidasas y combinaciones de las mismas,

dicha CBHI modificada presente en dicha mezcla de enzimas en de 55 a 100% en peso, con relación a todas las enzimas tipo CBHI,

en donde dicho substrato lignocelulósico pretratado se selecciona del grupo que consiste en tallos de maíz, paja de trigo, paja de cebada y tallos de soja, cáscaras de avena, cáscaras de arroz, bagazo de caña de azúcar y fibra de maíz, mijo perenne, miscantus, espartina y ballico, madera de angiospermas, eucalipto y serrín.

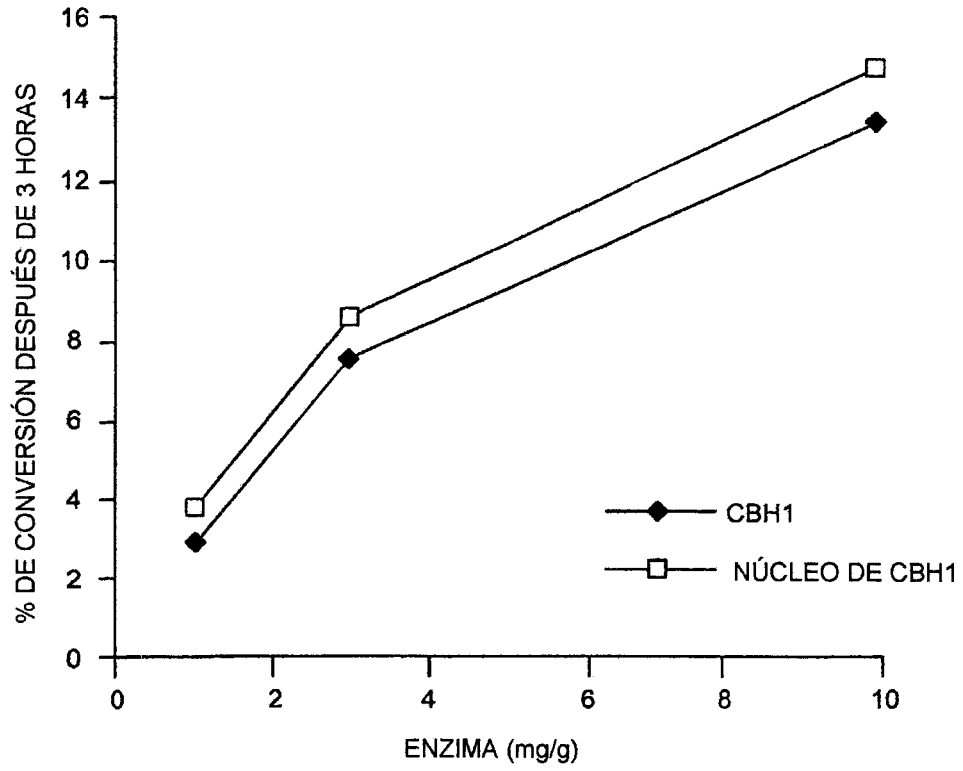


FIG. 1A

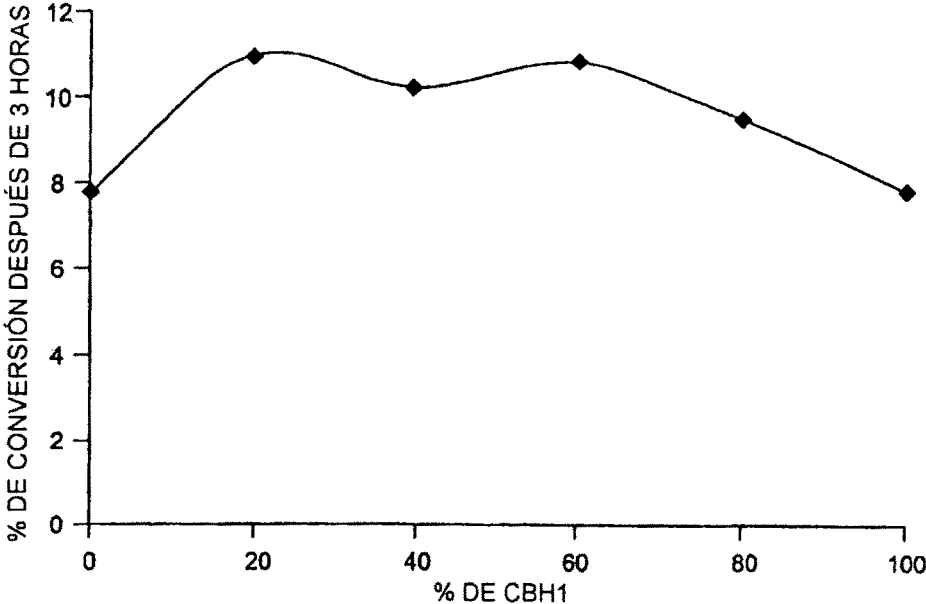


FIG. 1B

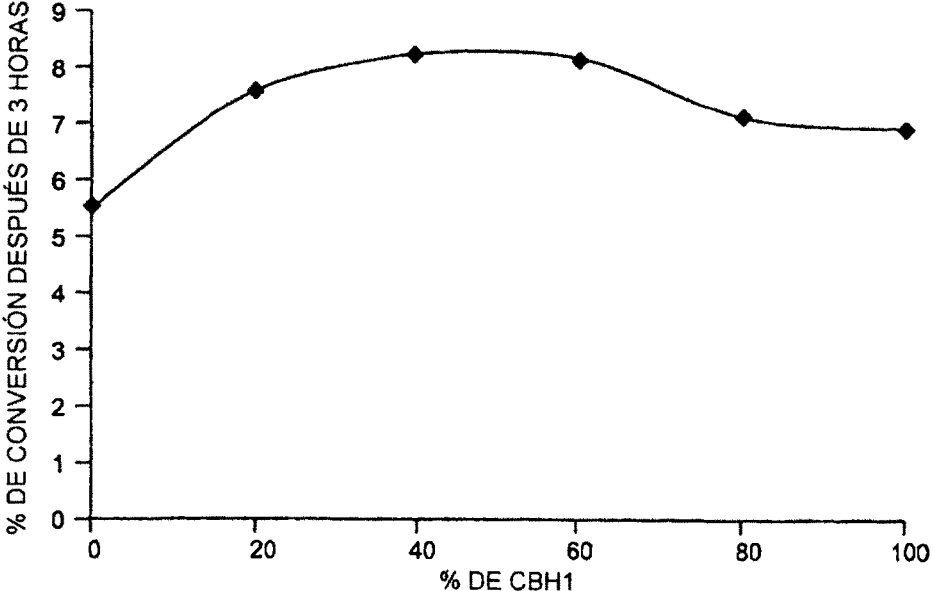


FIG. 1C

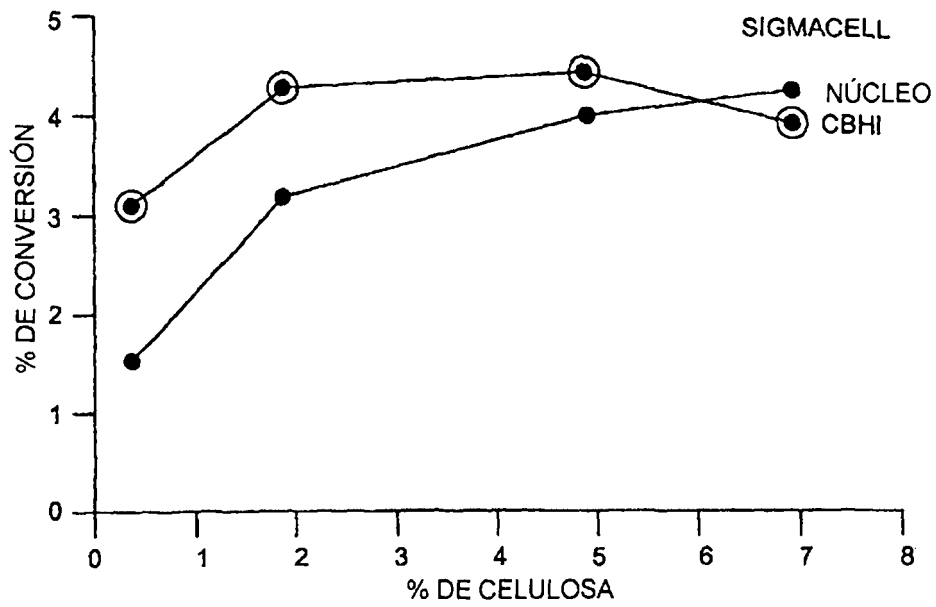


FIG. 2A

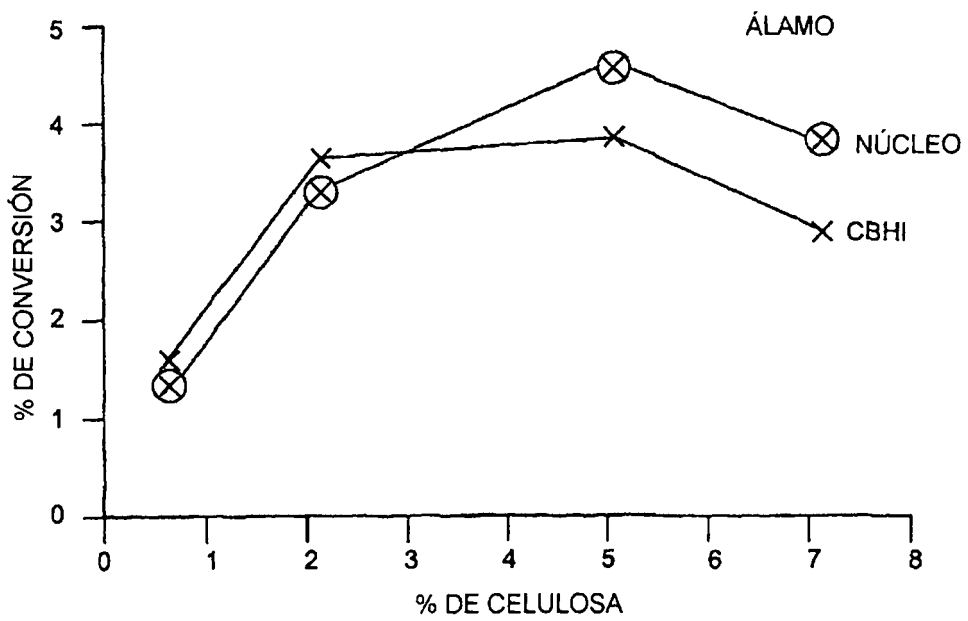


FIG. 2B

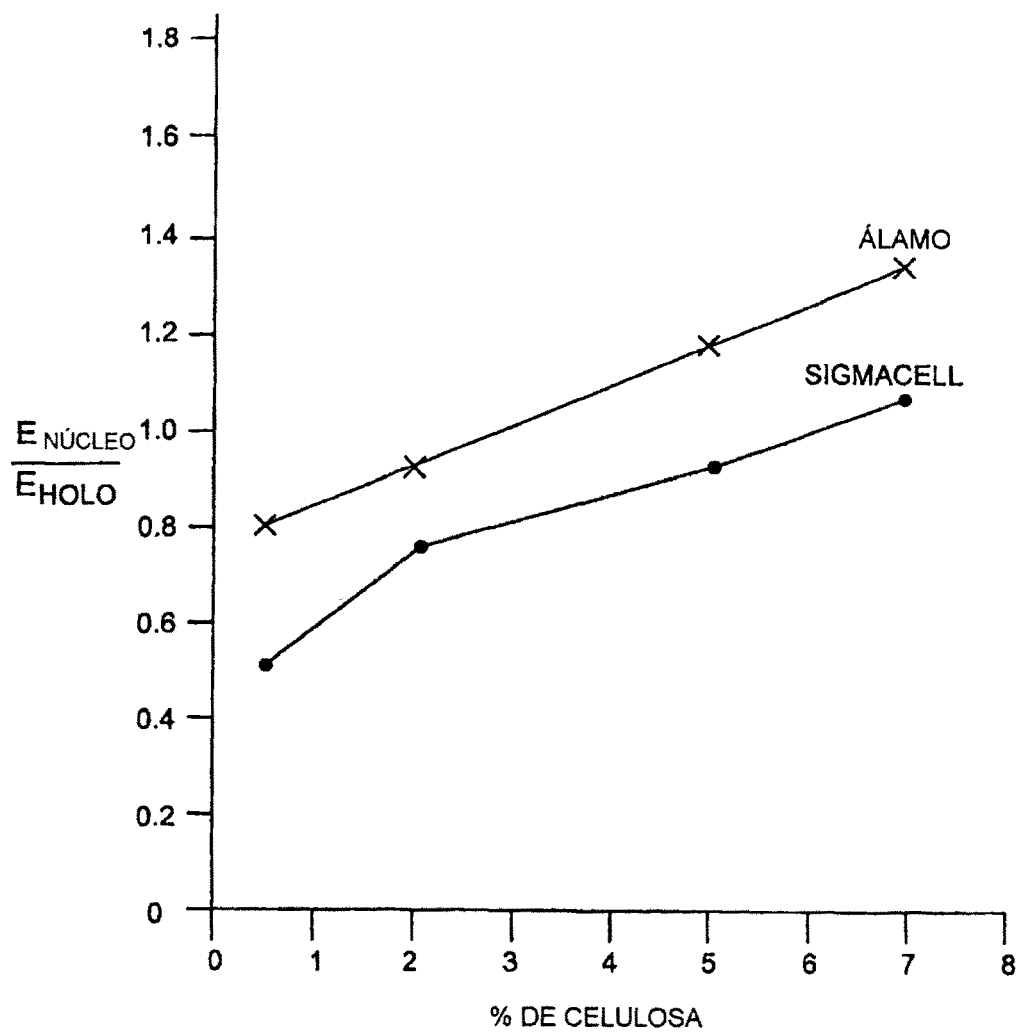


FIG. 2C

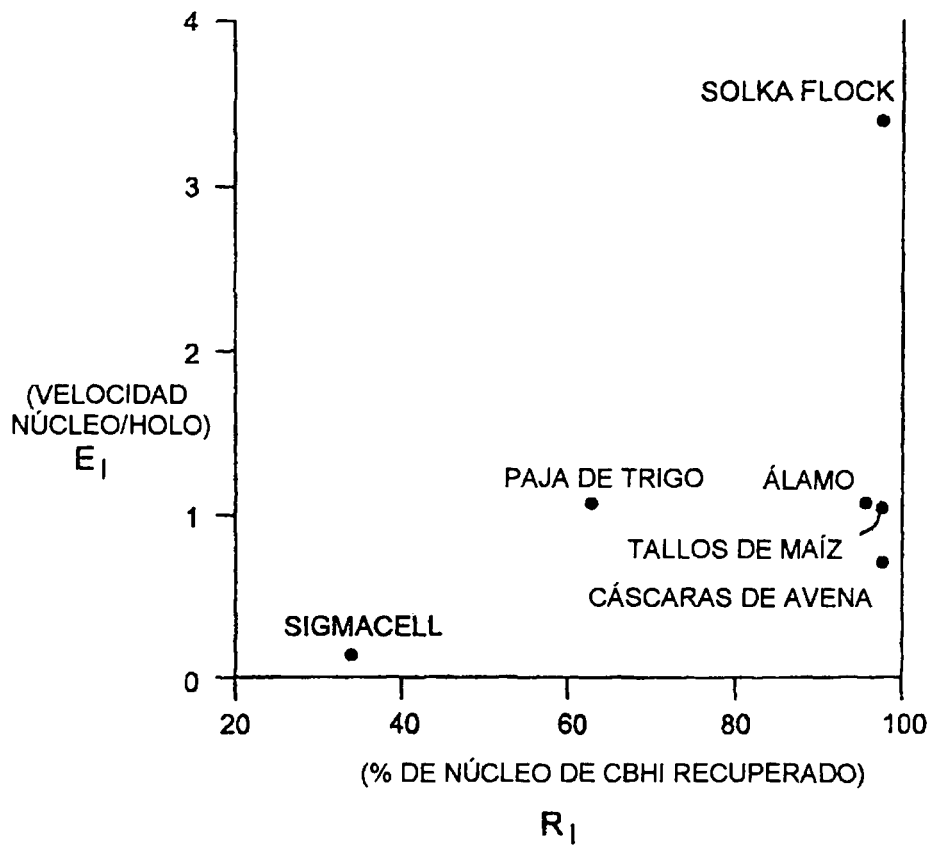


FIG. 3

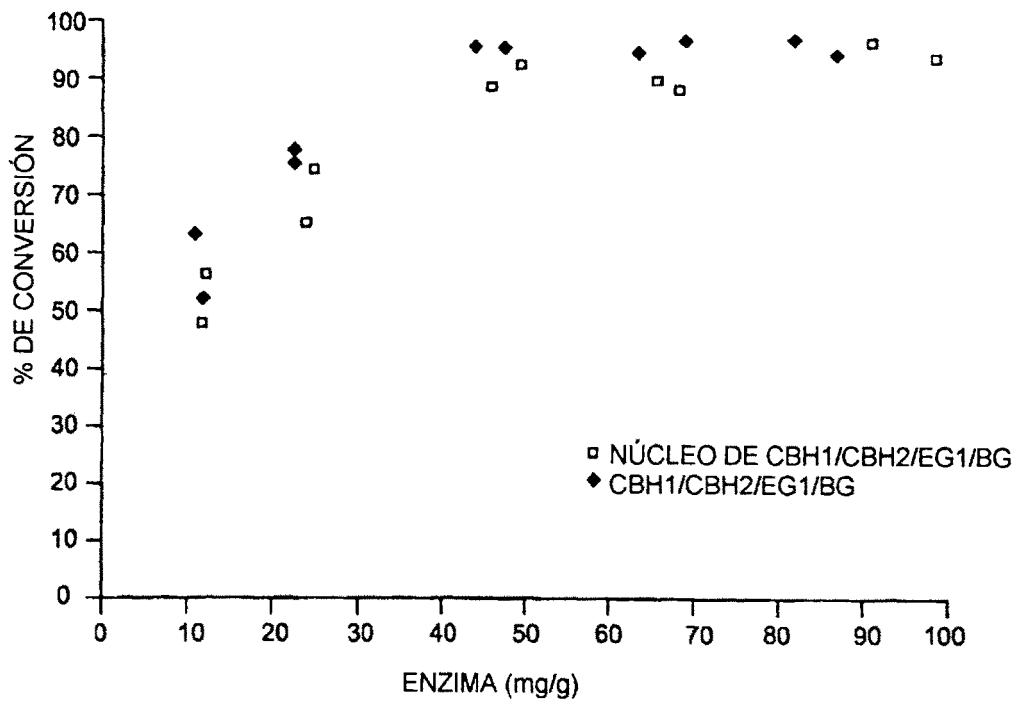


FIG. 4