



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 378 488**

⑯ Int. Cl.:  
**C12N 9/42** (2006.01)  
**C12N 1/14** (2006.01)  
**C12P 19/14** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑯ Número de solicitud europea: **07791995 .9**  
⑯ Fecha de presentación: **31.07.2007**  
⑯ Número de publicación de la solicitud: **2150615**  
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2010**

⑮

Título: **Procedimiento para la producción de celulasa y hemicelulasa con alta actividad hidrolítica**

⑯ Prioridad:  
**07.05.2007 JP 2007122694**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.04.2012**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.04.2012**

⑯ Titular/es:

**NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED  
INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY  
3-1, KASUMIGASEKI 1-CHOME CHIYODA-KU  
TOKYO 100-8921, JP y  
TSUKISHIMA KIKAI CO., LTD.**

⑯ Inventor/es:

**FANG, Xu;  
YANO, Shinichi;  
INOUE, Hiroyuki;  
SAWAYAMA, Shigeki;  
OKUDA, Naoyuki;  
SATO, Masanori y  
KURODA, Masashi**

⑯ Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 378 488 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

Procedimiento para la producción de celulasa y hemicelulasa con alta actividad hidrolítica

## 5 Campo de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere a la cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus*, la cual es un nuevo microorganismo perteneciente al género *Acremonium* y posee la capacidad de producir celulasa en grandes cantidades.

10

**[0002]** La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de celulasa y/o hemicelulasa usando el microorganismo, y a un procedimiento para la degradación o sacarificación de biomasa usando la celulasa y/o hemicelulasa, como se define en las reivindicaciones.

## 15 Antecedentes de la invención

**[0003]** "Celulasa" es un nombre colectivo que denota el grupo de enzimas que cataliza un sistema de reacciones enzimáticas en el que la celulosa se hidroliza a glucosa, celobiosa o celooligotosa. Dependiendo del mecanismo catalítico, las enzimas se denominan FPasa, CMCasa, celobiasa y similares. La celulasa degrada la celulosa a glucosa como producto final de degradación por interacción de tales enzimas.

**[0004]** "Hemicelulasa" es un nombre colectivo que denota el grupo de enzimas que cataliza un sistema de reacciones enzimáticas en el que la hemicelulosa se hidroliza a xilosa, arabinosa, manosa, galactosa o similares. Dependiendo del mecanismo catalítico, las enzimas se denominan xilanasa, arabinanasa, arabinofuranosidasa, mananasa, galactanasa, xilosidasa, manosidasa y similares.

**[0005]** Hasta ahora, los microorganismos tales como *Trichoderma reesei* (Biotechnol. Bioeng., 23, 1837-1849 (1981)), *Trichoderma viride* (*T. viride*) (Appl. Biochem. Biotechnol., 57-58, 349-360 (1996)) y los microorganismos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y similares se han usado como hongos productores de celulasa para la producción de celulasa y/o hemicelulasa, las cuales se pueden usar para la sacarificación de biomasa lignocelulósica. Sin embargo, mediante el uso de tales microorganismos no ha sido posible lograr una productividad satisfactoria de celulasa, lo que es un inconveniente. Además, la celulasa producida no presentaba una capacidad suficiente para degradar celulosa, lo que significa que las enzimas de celulosa conocidas no pueden degradar por completo la celulosa a glucosa. Por consiguiente, existe el problema de que durante la degradación de celulosa se produce y persiste una gran cantidad de celobiosa y celooligosacáridos, que son productos intermedios.

**[0006]** Para resolver los problemas antes mencionados se ha intentado aislar detenidamente de la naturaleza microorganismos con una alta capacidad para producir celulasa y una capacidad para producir celulasa con una alta actividad. Como resultado, los autores han aislado del suelo un microorganismo perteneciente a *Acremonium cellulolyticus* que es capaz de degradar sustancialmente por completo la celulosa a glucosa (documento JP 59-166081 A (1984)). Los autores han descubierto además que la cepa C1 mutante de *Acremonium cellulolyticus* (FERM P-18508) presenta una mayor capacidad para producir celulasa en comparación con dicho microorganismo parental (documento JP 2003-135052 A).

**[0007]** En los últimos años ha habido un gran interés en que la biomasa sea sometida a degradación y sacarificación enzimáticas usando celulasa y/o hemicelulasa para convertirla en unidades constituyentes, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa y galactosa, las cuales se usan para producir productos de fermentación, tales como etanol y ácido láctico, que se pueden usar como combustible líquido o agentes químicos. Así, se ha llevado a cabo activamente el desarrollo de una tecnología para la aplicación práctica de la biomasa. Por lo tanto, para el propósito de un uso económico y práctico de la biomasa, existe una gran demanda de microorganismos con capacidad para producir celulasa en mayor cantidad que los hongos productores de celulasa conocidos descritos anteriormente.

**[0008]** En las circunstancias antes descritas, es un objetivo de la presente invención producir celulasa y/o hemicelulasa eficazmente y degradar o sacarificar biomasa eficazmente mejorando la capacidad para producir celulasa en microorganismos productores de celulasa.

Resumen de la invención

**[0009]** Como resultado de los intensos estudios para alcanzar los objetivos anteriores los autores han descubierto

ahora que la cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus*, que se ha obtenido como mutante de la cepa C1 de *Acremonium cellulolyticus* (FERM P-18508), presenta mayores actividades celulasa, en particular actividades FPasa, celobiosa y avicelasa, que la cepa C1, así como una mayor capacidad para producir celulasa. De este modo se ha completado la presente invención.

5

**[0010]** La presente invención proporciona (1) un procedimiento para la producción de celulasa y/o hemicelulasa y (2) un procedimiento para la sacarificación o degradación de biomasa tal y como se definen en las reivindicaciones.

10

**[0011]** La invención también proporciona la cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus* (FERM BP-10848).

15

**[0012]** De acuerdo con la presente invención, la productividad de celulasa se puede mejorar considerablemente con el uso de la cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus*, que es un nuevo microorganismo perteneciente al género *Acremonium* con una alta capacidad para producir celulasa. Además, como se define en las reivindicaciones, se puede degradar y sacarificar biomasa eficazmente mediante el uso de la celulasa y/o hemicelulasa producida por tal microorganismo. Así, la presente invención tiene tales efectos significativos.

Breve descripción de los dibujos

20

**[0013]**

La figura 1 muestra los resultados de los experimentos de sacarificación de paja de arroz usando el medio de cultivo de la cepa CF-2612 o de la cepa C1. Los símbolos significan lo siguiente: símbolo negro, el medio de cultivo de la cepa CF-2612 (17,7 UPF/ml); símbolo blanco, el medio de cultivo de la cepa C1 (11,9 UPF/ml); "V", control (al que se añadió el mismo volumen de agua destilada en lugar del medio de cultivo); "□", glucosa; "◊", xilosa; "Δ", arabinosa; y "O", manosa.

La figura 2 muestra los resultados de los experimentos de sacarificación de eucalipto en polvo usando el medio de cultivo de la cepa CF-2613 o de la cepa C1. Los símbolos significan lo siguiente: símbolo negro, el medio de cultivo de la cepa DF-2612 (17,7 UPF/ml); símbolo blanco, el medio de cultivo de la cepa C1 (11,9 UPF/ml); "■", control (al que se añadió el mismo volumen de agua destilada en lugar del medio de cultivo); "O", glucosa; y "Δ", xilosa.

Descripción detallada de la invención

35

**[0014]** A continuación se describirá la presente invención con más detalle.

35

**[0015]** El término "celulasa" como se usa en la presente memoria es un nombre colectivo para las enzimas implicadas en la degradación de celulosa, tales como FPasa, CMCasa, avicelasa y celobiosa descritas anteriormente. En la invención, la celulasa abarca cualquier enzima con una actividad degradadora de celulosa.

40 **[0016]** La celulosa es un polímero de glucosa en el que la glucosa está altamente polimerizada mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, y se encuentra como componente de la pared celular en todos los tipos de plantas.

45 **[0017]** El término "hemicelulasa" como se usa en la presente memoria es un nombre colectivo para las enzimas capaces de degradar hemicelulosa. Además, la hemicelulosa excluye celulosa y pectina de entre los polisacáridos que constituyen las paredes celulares de las células de plantas terrestres.

50 **[0018]** De acuerdo con la presente invención, la expresión "hongo productor de celulasa" abarca microorganismos capaces de producir celulasa y microorganismos capaces de producir tanto celulasa como hemicelulasa. Ejemplos de los microorganismos incluyen hongos aislados de fuentes naturales, mutantes de los mismos y hongos genéticamente recombinantes derivados de ellos. La presente invención proporciona y usa el hongo productor de celulasa *Acremonium cellulolyticus*, cepa CF-2612, que se ha obtenido como mutante de la cepa C1 de *Acremonium cellulolyticus*.

55 **[0019]** La cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus* de la invención ha sido depositada el 10 de abril de 2007 ante la Autoridad de Depósito Internacional en el Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón) bajo el número de acceso FERM P-21290, cepa que posteriormente se transfirió al depósito internacional según las condiciones del Tratado de Budapest del 4 de julio de 2007 bajo el número de acceso FERM BP-10848.

**[0020]** La expresión "capacidad para producir celulasa" como se usa en la presente memoria se refiere a una capacidad por medio de la cual se produce celulasa. La capacidad para producir celulasa se vuelve mayor a medida que aumenta la actividad enzimática total de la celulasa.

5 **[0021]** Como se usa en la invención, el término "biomasa" abarca biomasa basada en celulosa y/o basada en lignocelulosa producida por plantas o algas. Ejemplos de tal biomasa incluyen, pero no se limitan a, madera, salvado de trigo, paja, paja de arroz, cáscaras de arroz, bagazo, pastel de soja, residuos de cuajada de soja, residuos de granos de café, salvado de arroz y residuos de hidrólisis. La expresión "residuos de hidrólisis" como se usa en la presente memoria se refiere a los residuos que se pueden obtener mediante un tratamiento hidrolítico de la biomasa con ácidos, 10 enzimas y similares.

**[0022]** Como se usa en la invención, el procedimiento de "cultivo" incluye cultivos líquidos y cultivos sólidos pero no está limitado a dichos procedimientos de cultivo, siempre que los microorganismos seleccionados se puedan cultivar.

15 **[0023]** Como se usa en la invención, la expresión "degradar o sacrificar biomasa" se refiere a la degradación de la celulosa y/o hemicelulosa contenida en la biomasa, convirtiéndola de este modo en oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos o mezclas de los mismos. En otras palabras, esta expresión significa la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de los polisacáridos con celulasa y/o hemicelulasa.

20 (Cultivo de un hongo productor de celulasa)

**[0024]** Como se describe específicamente en los ejemplos más adelante, es posible cultivar el hongo productor de celulasa.

25 **[0025]** El medio usado para cultivar el hongo productor de celulasa puede comprender: fuentes de carbono, tales como celulosa en polvo (incluido avicel), celobiosa, papeles de filtro, papeles generales, papeles de desecho, madera, salvado de trigo, paja, paja de arroz, cáscaras de arroz, bagazo, pastel de soja, residuos de cuajada de soja, residuos de granos de café, salvado de arroz, lactosa, lactosa hidratada, suero, productos lácteos, residuos de hidrólisis y 30 mezclas de los mismos; fuentes de nitrógeno, tales como sales de amonio inorgánicas (por ejemplo, sulfato de amonio y nitrato de amonio) y materiales orgánicos que contienen nitrógeno (por ejemplo, urea, aminoácidos, extractos de carne, extractos de levadura, polipeptona y productos de degradación de proteínas); y sales inorgánicas, tales como sulfato de magnesio, dihidrogenofosfato de potasio, tartrato potásico, sulfato de cinc, sulfato de magnesio, sulfato de cobre, cloruro cálcico, cloruro de hierro y cloruro de manganeso. Si fuera necesario, se puede usar un medio que 35 contiene trazas de nutrientes orgánicos. Asimismo se puede usar un medio sólido al que se ha añadido agar o gelatina para la solidificación, un medio semiliquido al que se ha añadido agar a una concentración baja o solo un medio líquido que contiene componentes de medio (es decir, caldo). El medio preferido es un medio líquido.

**[0026]** La temperatura de cultivo y el tiempo de cultivo pueden variar dependiendo de los tipos de hongos productores de celulasa. En general, el cultivo se puede efectuar a una temperatura comprendida en el intervalo de 40 aproximadamente 28 °C a aproximadamente 32 °C durante un periodo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 10 días.

**[0027]** Ejemplos de un tanque de fermentación que se puede usar para el cultivo incluyen un tanque de aireación-agitación, un tanque de tipo columna de burbujeo, un tanque de lecho fluidizado y un tanque de lecho empacado.

45 **[0028]** Las células fúngicas se eliminan del medio de cultivo anterior mediante un procedimiento conocido que implica centrifugación, filtración o similares, de manera que se obtiene el sobrenadante. El sobrenadante se puede usar directamente en forma de solución enzimática bruta.

50 (Purificación de celulasa y/o hemicelulasa)

**[0029]** La celulasa y/o hemicelulasa se puede purificar a partir del sobrenadante anterior mediante cualquiera de los procedimientos conocidos siguientes usados para la purificación de proteínas o mediante una combinación de dos o más de tales procedimientos: a saber, precipitación por sales con sulfato de amonio; separación por precipitación con 55 un disolvente orgánico (por ejemplo, etanol, metanol o acetona); cromatografía, tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía isoelectrónica, cromatografía de filtración en gel, cromatografía hidrofoba, cromatografía en columna de adsorción, cromatografía en columna de afinidad en gel con sustrato o anticuerpo unido o cromatografía en columna de fase inversa; y tratamientos de filtración, tales como microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa.

## (Inmovilización de celulasa y/o hemicelulasa)

**[0030]** La celulasa y/o hemicelulasa purificada se puede inmovilizar. La celulasa y/o hemicelulasa inmovilizada es generalmente tan estable que se puede usar de forma continua y repetidas veces. Por lo tanto, resulta ventajosa la 5 enzima inmovilizada. La inmovilización de celulasa y/o hemicelulasa se puede llevar a cabo mediante un procedimiento de unión a un soporte, un procedimiento de reticulación o un procedimiento de inclusión. De acuerdo con el procedimiento de unión a un soporte, la celulasa y/o hemicelulasa se puede(n) unir a un soporte insoluble en agua (por ejemplo, gel de poliacrilamida, resina de poliestireno, vidrio poroso u óxidos metálicos) mediante adsorción física, unión iónica y unión covalente. De acuerdo con el procedimiento de reticulación, las enzimas se inmovilizan reticulándolas 10 mediante un reactivo que contiene dos o más grupos funcionales. Ejemplos de un reactivo reticulante que se puede usar incluyen glutaraldehído que forma una base de Schiff, un derivado de ácido isociánico que forma enlaces peptídicos, N,N'-etilenmaleimida, bis-diazobenceno que forma un acoplamiento diazoico y N,N'-polimetilen-bis-yodoacetamida que provoca una alquilación. El procedimiento de inclusión implica la formación de redes, en la que la 15 celulasa y/o hemicelulasa se incorpora(n) en pequeñas redes de gel polimérico, o la microencapsulación, en la que la celulasa y/o hemicelulasa se encapsula(n) por medio de una membrana semipermeable. En el caso del procedimiento que implica la formación de redes, se puede usar una sustancia polimérica sintética, tal como gel de poliacrilamida o polí(alcohol vinílico), o un compuesto polimérico tal como una resina fotoendurecible. En el caso del procedimiento que 20 implica la microencapsulación, se puede usar hexametilendiamina, cloruro de sebacoílo, poliestireno, lecitina o similares (Saburo Hukui, Ichiro Chibata, Shuichi Suzuki, "Enzyme Engineering (Kohso Kogaku)", Tokyo Kagaku Dozin, Tokio, Japón, 1981).

## (Medición de la actividad celulasa)

**[0031]** La actividad celulasa se puede medir mediante el siguiente procedimiento. Se añade un sustrato, tal como 25 papel de filtro, carboximetilcelulosa (CMC), celulosa microcristalina (Avicel), salicina o celobiosa, al sobrenadante anterior o a la celulasa purificada; se deja que la reacción enzimática transcurra durante un cierto periodo de tiempo; se realizan el método de Somogy-Nelson y el método DNS para el desarrollo del color del azúcar reductor obtenido; y se efectúa una determinación colorimétrica a una longitud de onda determinada.

30 **[0032]** De acuerdo con el método de Somogy-Nelson, se añade el reactivo de cobre de Somogy (Wako Pure Chemical Industries, Tokio, Japón) a la mezcla de reacción anterior una vez transcurrida la reacción durante un cierto periodo de tiempo, deteniendo de este modo la reacción. Después, la mezcla de reacción se hierve durante aproximadamente 20 minutos y a continuación se enfriá inmediatamente con el uso de agua del grifo. Tras el enfriamiento se inyecta el reactivo de Nelson en la mezcla de reacción de manera que el precipitado de cobre reducido 35 se disuelva, dando como resultado el desarrollo del color. El producto resultante se deja reposar durante aproximadamente 30 minutos y después se añade agua destilada. Seguidamente se mide la absorbancia.

**[0033]** Cuando se usa el método DNS, se añade una solución enzimática a una solución de sustrato CMC al 1 % y 40 después se realiza la reacción enzimática durante un cierto periodo de tiempo. La reacción enzimática se termina por la ebullición o similares. Después se añade ácido dinitrosalicílico a la mezcla de reacción y seguidamente se hierve durante 5 minutos. Tras el enfriamiento se mide la absorbancia (Yutaka Kashiwagi, citado anteriormente).

## (Degradación o sacarificación de biomasa)

45 **[0034]** Como técnica para degradar o sacarificar cualquier biomasa se pueden usar procedimientos conocidos. Por ejemplo, la biomasa se puede usar bien en forma seca o bien en forma húmeda. Para aumentar la velocidad de procesamiento resulta preferible fragmentar o triturar toscamente la biomasa antes del uso hasta un tamaño de 100 a 1.000 µm. Con este fin se pueden usar máquinas convencionales, tales como un molino de bolas, un molino vibratorio, un molino de corte, un molino de martillos, un molino de Wiley y un molino de chorro. A continuación, la biomasa que ha 50 sido fragmentada o triturada toscamente se suspende en un medio acuoso, después de lo cual se añade un sobrenadante de cultivo que contiene celulasa o hemicelulasa o una combinación de ellas, o se añade celulasa y/o hemicelulasa purificada o inmovilizada. El producto resultante se calienta con agitación o sacudimiento. De este modo, la biomasa se puede degradar o sacarificar. En el procedimiento anterior, el pH y la temperatura de la mezcla de reacción pueden encontrarse en un intervalo tal que no causen la desactivación de la celulasa y/o la hemicelulasa. En 55 general, cuando la reacción se realiza a presión atmosférica, la temperatura puede encontrarse entre 5 °C y 95 °C, y el pH puede encontrarse entre 1 y 11. Por ejemplo, se puede añadir el sobrenadante de cultivo que contiene entre 0,25 y 1 l de un tampón acetato (0,05 M, pH 4,8) y entre 0,01 y 0,2 l de celulasa (por ejemplo, 10 a 20 U/ml) o celulasa purificada a 50 g de paja de arroz fragmentada. Después, la solución resultante se agita o sacude entre 45 °C y 60 °C de manera que la biomasa se degrade o sacarifique. La reacción enzimática también se puede realizar de forma

discontinua o continua.

### Ejemplos

5 [0035] La presente invención se describirá a continuación con más detalle mediante los ejemplos siguientes, si bien el alcance de la presente invención no está limitado a ellos.

Cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus* (denominada en lo sucesivo cepa CF-2612)

10 (1) Procedimiento para la obtención de la cepa CF-2612

[0036] Una cepa parental (cepa C1 de *Acremonium cellulolyticus* (FERM P-18508; denominada en lo sucesivo cepa C1)) se sometió a un cultivo aerobio a 30 °C durante 24 horas, después de lo cual se irradió con rayos ultravioletas (UV). Después, las células resultantes se incubaron a 30 °C. Las cepas mutantes con una mayor actividad se criaron 15 de las colonias crecidas, a lo que siguió una segunda mutación de las primeras cepas mutantes, que se realizó mediante el mismo procedimiento. Después se criaron las cepas mutantes con una mayor actividad que las anteriores y se sometieron después a una tercera mutación mediante un tratamiento con NTG. De este modo se obtuvo la cepa mutante CF-2612. La cepa CF-2612 presenta las siguientes propiedades morfológicas.

20 (2) Propiedades morfológicas de la cepa CF-2612 en cultivo

[0037] La cepa CF-2612 y la cepa C1 se cultivaron por separado en 3 tipos de medios agar selectivos durante 7 a 14 días para la observación de las propiedades morfológicas. Los resultados se muestran más adelante.

25 [Cultivo en medio agar selectivo A que contiene una fuente de carbono]

(Medio selectivo A)

[0038] Glucosa 50 g/l  
 30 Sulfato de amonio 5 g/l  
 Urea 2 g/l  
 Sulfato de magnesio 1,2 g/l  
 Dihidrogenofosfato de potasio 24 g/l  
 Tartrato potásico 4,7 g/l  
 35 Sulfato de cinc 10 mg/l  
 Sulfato de manganeso 10 mg/l  
 Sulfato de cobre 9 mg/l  
 Tween 80 1 g/l  
 Agar 20 g/l  
 40 pH 4,0

[0039] La observación visual de las colonias de las cepas C1 y CF-2612 cultivadas en el medio selectivo A mostró que la cepa C1 presentaba un aspecto ligeramente rojo parduzco, floculento y ligeramente sobresaliente, mientras que la cepa CF-2612 creció generando una forma altamente angular con muchas rugosidades similares a una cápsula de 45 granada. El diámetro de las colonias difería de una colonia a otra: a saber, entre 18 y 20 mm para la cepa C1 y entre 10 y 13 mm para la cepa CF-2612.

[Cultivo en medio agar selectivo B]

50 (Medio selectivo B)

[0040] El medio usado se preparó eliminando la glucosa de la fuente de carbono del medio selectivo A y añadiendo en su lugar lo siguiente:

55 celulosa en polvo 25 g/l; y  
 carboximetilcelulosa (CMC) 25 g/l.

[0041] La observación visual de las colonias de las cepas C1 y CF-2612 cultivadas en el medio selectivo B mostró que la cepa C1 presentaba un aspecto floculento, ligeramente sobresaliente o pliegues radiales en la superficie,

mientras que la cepa CF-2612 presentaba pliegues suaves e irregulares pero no hifas blancas floculentas. El diámetro de las colonias difería de una colonia a otra: a saber, entre 15 y 18 mm para la cepa C1 y entre 10 y 13 mm para la cepa CF-2612.

5 [Cultivo en medio agar patata que contiene dextrosa]

(Medio agar patata dextrosa)

**[0042]** Percolato de patata 4 g/l

10 Glucosa 20 g/l

Agar 15 g/l

pH 5,6 ± 0,2

**[0043]** La observación visual de las colonias de las cepas C1 y CF-2612 cultivadas en el medio agar patata que contiene dextrosa mostró que la colonia de la cepa C1 presentaba un diámetro de 18 a 20 mm y una forma obviamente sobresaliente similar a la de un donut con un agujero central. Además, esta colonia tendía a penetrar en la porción inferior del medio y presentaba micelio blanco en racimos formado sobre la colonia roja parduzca. Por otra parte, en el caso de la cepa CF-2612, la colonia presentaba un diámetro de 10 a 13 mm y carecía de un agujero central. Además, se formaron pliegues profundos y, por lo tanto, aparecieron crestas blancas sobre la colonia.

20

Comparación de la actividad enzimática de la cepa CF-2612 y la cepa C1

**[0044]** La cepa CF-2612 y la cepa C1 se compararon entre sí en cuanto a la actividad enzimática de la celulasa. Se esterilizó un medio (para el cultivo de un hongo productor de celulasa) con la composición siguiente mediante un procedimiento convencional y a continuación se inoculó con células fúngicas de cada cepa, después de lo cual se realizó un cultivo aerobio a 30 °C durante 7 días. El sobrenadante obtenido por centrifugación del cultivo se sometió a una medición de la actividad enzimática de la celulasa producida.

(Composición del medio)

30

**[0045]** Celulosa en polvo 50 g/l

Sulfato de amonio 5 g/l

Urea 4 g/l

Sulfato de magnesio 1,2 g/l

35 Dihidrogenofosfato de potasio 24 g/l

Tartrato potásico 4,7 g/l

Sulfato de cinc 10 mg/l

Sulfato de manganeso 10 mg/l

Sulfato de cobre 10 mg/l

40 Tween 80 1 g/l

pH 4,0

**[0046]** La medición anterior de la actividad enzimática se realizó mediante el procedimiento siguiente.

45 [Ensayo de la actividad enzimática]

**[0047]** FPasa: Se usó papel de filtro (Whatman nº 1,1 x 6 cm) como sustrato. Se añadieron al sustrato el sobrenadante de cultivo diluido adecuadamente (0,5 ml) y tampón citrato (pH 4,8, 0,05 M) (1,0 ml) y seguidamente se realizó la reacción enzimática a 50 °C durante 1,0 hora. Después se añadieron 3,0 ml de reactivo ácido dinitrosalicílico y 50 seguidamente se calentó a 100 °C durante 5 minutos para el desarrollo del color. Tras el enfriamiento se añadieron 200 µl del producto resultante a 2,5 ml de agua destilada, después de lo cual se efectuó una colorimetría a una longitud de onda de 540 nm. En este caso, se definió como 1 unidad (U) la cantidad de enzima a la que se produce azúcar reductor en una cantidad correspondiente a 1 µmol de glucosa por minuto.

55 **[0048]** CMCA: Se mezclaron volúmenes iguales de la solución enzimática diluida adecuadamente y una solución de carboximetilcelulosa sódica al 2 % (disuelta en tampón citrato (pH 4,8, 0,05 M)) y seguidamente se realizó la reacción enzimática a 50 °C durante 30 minutos. Después se añadieron 3,0 ml del reactivo ácido dinitrosalicílico y seguidamente se calentó a 100 °C durante 5 minutos para el desarrollo del color. Tras el enfriamiento se añadieron 200 µl del producto resultante a 2,5 ml de agua destilada, después de lo cual se efectuó una colorimetría a una longitud de

onda de 540 nm. En este caso, se definió como 1 unidad (U) la cantidad de enzima a la que se produce azúcar reductor en una cantidad correspondiente a 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto.

**[0049]** Avicelasa: Se mezclaron volúmenes iguales de la solución enzimática diluida adecuadamente y 1 ml de 5 tampón acetato (pH 4,8, 0,1 M) que contenía 10 mg de avicel, y seguidamente se realizó la reacción enzimática a 50 °C durante 2 horas. Después se añadieron 3,0 ml del reactivo ácido dinitrosalicílico y seguidamente se calentó a 100 °C durante 5 minutos para el desarrollo del color. Tras el enfriamiento se añadieron 200  $\mu$ l del producto resultante a 2,5 ml de agua destilada, después de lo cual se efectuó una colorimetría a una longitud de onda de 540 nm. En este caso, se definió como 1 unidad (U) la cantidad de enzima a la que se produce azúcar reductor en una cantidad correspondiente 10 a 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto.

**[0050]** Actividad celobiosa: Se mezclaron volúmenes iguales de la solución enzimática diluida adecuadamente y 1 ml de una solución de celobiosa 15 mM en tampón citrato (pH 4,8, 0,05 M), y seguidamente se realizó la reacción enzimática a 50 °C durante 30 minutos. Después, la reacción enzimática se terminó por calentamiento a 100 °C durante 15 5 minutos. La concentración de glucosa en la solución se midió usando un kit de ensayo de laboratorio (Glu-CII, Wako Pure Chemicals, Tokio, Japón). En este caso, se definió como 1 unidad (U) la cantidad de enzima a la que se produce azúcar reductor en una cantidad correspondiente a 2  $\mu$ moles de glucosa o 1  $\mu$ mol de celobiosa por minuto.

**[0051]** Los resultados se muestran en la tabla 1.

20

Cepa	FPasa [U/ml]	CMCasa [U/ml]	Avicelasa [U/ml]	Celobiosa [U/ml]
C1	11,90	76,59	2,63	21,91
CF-2612	17,71	64,92	5,49	38,63

**[0052]** De la tabla 1 se desprende que la actividad enzimática total de la celulasa contenida en el sobrenadante obtenido del cultivo de la cepa CF-2612 era mayor que la de la cepa C1 y que los niveles de actividad de, en particular, la FPasa, la celobiosa y la avicelasa eran significativamente elevados. Esto sugiere que la cepa CF-2612 tiene la 25 capacidad de producir tales enzimas en mayores cantidades que la cepa C1.

#### Comparación del efecto de sacarificación de la cepa CF-2612 y la cepa C1

**[0053]** Las cepas se compararon entre sí con respecto a sus efectos de sacarificación con el uso de los medios de 30 cultivo anteriores de la cepa CF-2612 y la cepa C1.

(Composición de la mezcla de reacción)

**[0054]** Agua destilada 0,7 ml  
35 Tampón acetato 0,5 M (pH 4,8) 0,1 ml  
Paja de arroz o eucalipto en polvo (que se trituró durante 4 horas usando un molino de bolas) 50 mg  
Los medios de cultivo de la cepa CF-2612 y la cepa C1 (0,2 ml de cada uno) se añadieron por separado a la mezcla de reacción anterior para reaccionar a 45 °C.  
40 **[0055]** La fig. 1 muestra los resultados experimentales para el caso de usar paja de arroz para la mezcla de reacción. El experimento de sacarificación de paja de arroz mostró que la cantidad de glucosa producida en el medio de cultivo de la cepa CF-2612 era mayor que la del medio de cultivo de la cepa C1, lo que indica que la tasa de sacarificación (o % de sacarificación) de la cepa CF-2612 es más elevada. Además, cuando se usó el medio de cultivo de la cepa CF-2612 para la sacarificación, se generó arabinosa; sin embargo, cuando se usó el medio de cultivo de la cepa C1 para la 45 sacarificación, no se encontró arabinosa en la solución sacarificada. Esto sugiere que en el medio de cultivo de la cepa CF-2612 estaban contenidas la arabinanasa y/o la arabinofuranosidasa, mientras que en el medio de cultivo de la cepa C1 no estaba contenida ni la arabinanasa ni la arabinofuranosidasa.

**[0056]** La fig. 2 muestra los resultados experimentales para el caso de usar eucalipto en polvo como sustrato. Este 50 experimento mostró que la cantidad de glucosa producida en el medio de cultivo de la cepa CF-2612 era mayor que la del medio de cultivo de la cepa C1, lo que indica que la tasa de sacarificación (o % de sacarificación) de la cepa CF-2612 es más elevada.

**[0057]** Por lo tanto, estos resultados muestran que la cepa CF-2612 posee un efecto de sacarificación mayor que la 55 cepa C1 y que la cepa CF-2612 difiere de la cepa C1 en que la cepa CF-2612 tiene la capacidad de producir arabinanasa y/o arabinofuranosidasa.

Escalado del cultivo de la cepa CF-2612

**[0058]** Se esterilizó el medio (para el cultivo de un hongo productor de celulasa) con la composición descrita más adelante mediante un procedimiento convencional. Un cultivo previo de la cepa CF-2612 (50 ml) se sometió a un cultivo agitado aerobio a 30 °C durante 3 días. El mismo medio (0,95 l) se inoculó con el cultivo previo (50 ml) y después se realizó el cultivo aerobio en un fermentador de tanque a 30 °C durante 5 días. A continuación se añadieron 40 g/l de celulosa en polvo y 2 g/l de urea y seguidamente se cultivó durante 2 días. El cultivo resultante se centrifugó para obtener el sobrenadante, el cual se ensayó de la misma manera que antes en cuanto a la actividad FPasa. Como resultado, la actividad enzimática de la FPasa producida ascendió a 26,1 U/ml.

(Composición del medio)

**[0059]** Celulosa en polvo 60 g/l (40 g/l en el cultivo previo)  
15 Sulfato de amonio 5 g/l  
Urea 4 g/l (2 g/l en el cultivo previo)  
Sulfato de magnesio 1,2 g/l  
Dihidrogenofosfato de potasio 24 g/l  
Tartrato potásico 4,7 g/l  
20 Sulfato de cinc 10 mg/l  
Sulfato de manganeso 10 mg/l  
Sulfato de cobre 10 mg/l  
Tween 80 1 g/l  
pH 4,0  
25 Aplicabilidad industrial

**[0060]** La cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus* de la presente invención posee una alta capacidad para producir celulasa, lo que indica que se puede producir celulasa eficazmente con el uso de esta cepa. De acuerdo con la 30 presente invención, ventajosamente se puede degradar o sacrificar biomasa de forma económica y eficaz usando la celulasa y/o hemicelulasa producidas.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de celulasa y/o hemicelulasa, que comprende cultivar la cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus*, depositada bajo el nº de acceso FERM BP-10848, en un medio de cultivo y recoger la celulasa y/o hemicelulasa del cultivo o medio de cultivo.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la purificación de la celulasa y/o hemicelulasa.
- 10 3. Procedimiento para la sacarificación o degradación de biomasa, que comprende:
  - (A)cultivar la cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus*, depositada bajo el nº de acceso FERM BP-10848, en un medio de cultivo y sacarificar o degradar la biomasa en el cultivo o medio de cultivo que contiene celulasa y/o hemicelulasa; o
  - 15 (B)producir celulasa y/o hemicelulasa mediante el procedimiento de la reivindicación 1 ó 2 y sacarificar o degradar la biomasa usando la celulasa y/o hemicelulasa.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio de cultivo contiene una fuente de carbono seleccionada del grupo formado por celulosa en polvo, avicel, celobiosa, papeles de filtro, papeles generales, papeles de desecho, madera, salvado de trigo, paja, paja de arroz, cáscaras de arroz, bagazo, pastel de soja, residuos de cuajada de soja, residuos de granos de café, salvado de arroz, lactosa, lactosa hidratada, suero, productos lácteos, residuos de hidrólisis y mezclas de los mismos.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cultivo es un cultivo líquido o un cultivo sólido.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la celulasa es FPasa, CMCase, avicelasa, celobiasa o una mezcla de las mismas.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la hemicelulasa es xilanasa, arabinanasa, arabinofuranosidasa, mananasa, galactanasa, xilosidasa, manosidasa o una mezcla de las mismas.
8. Cepa CF-2612 de *Acremonium cellulolyticus* depositada bajo el nº de acceso FERM BP-10848.

Fig. 1

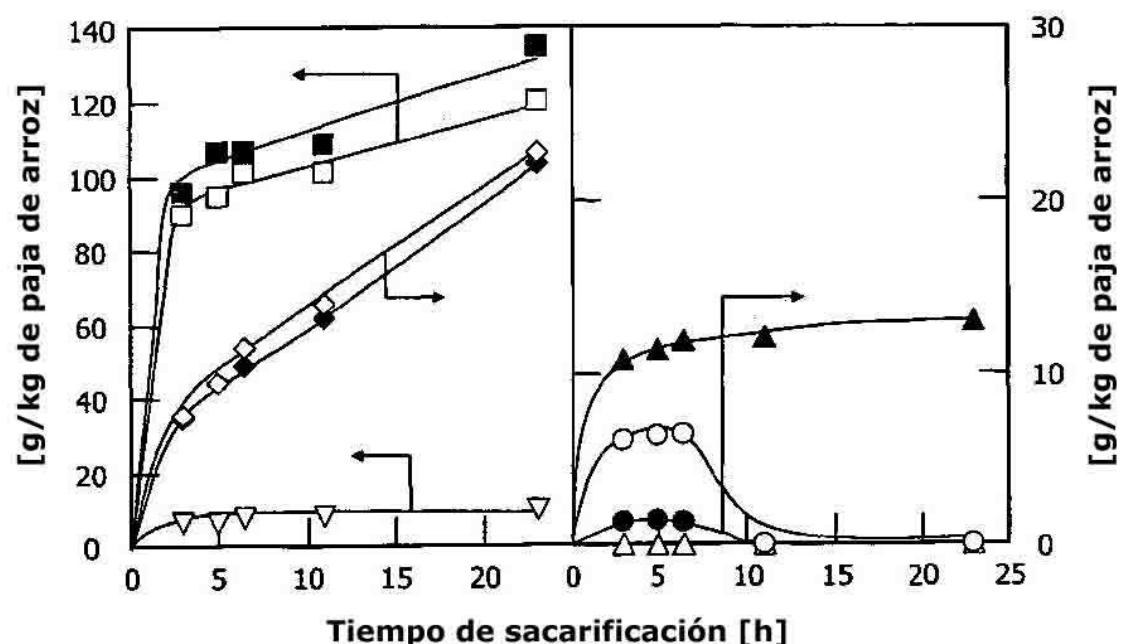


Fig. 2

