

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 064**

51 Int. Cl.:
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07875026 .2**
96 Fecha de presentación: **13.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2082054**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.07.2009**

54 Título: **Procedimiento para mejorar el rendimiento de los procedimientos de conversión de celulosa**

30 Prioridad:
13.11.2006 US 858579 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.07.2012

73 Titular/es:
Danisco US Inc.
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US

72 Inventor/es:
KELEMEN, Bradley;
LARENAS, Edmund A. y
MITCHINSON, Colin

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 385 064 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 mejorar el rendimiento de los procedimientos de conversión de celulosa.

3. CAMPO

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos para mejorar el rendimiento de azúcares deseables en la conversión enzimática de materiales celulósicos.

4. ANTECEDENTES

[0002] La producción de azúcares a partir de materiales celulósicos es conocida desde hace algún tiempo, al igual que la posterior fermentación y destilación de estos azúcares en etanol. Buena parte del desarrollo anterior tuvo lugar hacia la época de la II Guerra Mundial cuando existía una alta demanda de combustibles en algunos países como Alemania, Japón y la Unión Soviética. Estos primeros procedimientos estaban dirigidos principalmente a la hidrólisis ácida pero eran bastante complejos en su ingeniería y su diseño y resultaban muy sensibles a pequeñas variaciones en las variables del procedimiento, como la temperatura, la presión y las concentraciones de ácidos. Se presenta una exposición extensa de estos primeros procedimientos en "Production of Sugars From Wood Using High-pressure Hydrogen Chloride", Biotechnology and Bioengineering, Volumen XXV, en 2757 – 2773 (1983).

[0003] El abundante suministro de petróleo en el periodo comprendido entre la II Guerra Mundial y principios de la década de 1970 ralentizó la investigación en la conversión del etanol. Sin embargo, debido a la crisis del petróleo de 1973, los investigadores incrementaron sus esfuerzos para desarrollar procedimientos de cara a la utilización de madera y subproductos agrícolas para la producción de etanol como una fuente de energía alternativa. Esta investigación fue especialmente importante para el desarrollo del etanol como un aditivo de las gasolinas para reducir la dependencia de los Estados Unidos de la producción de petróleo en el exterior, para aumentar el índice de octano de los combustibles y para reducir los contaminantes de los gases de escape como una medida ambiental.

[0004] Al mismo tiempo que la "crisis del petróleo", como pasó a ser conocida, la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos promulgó regulaciones que exigían la reducción de aditivos de plomo en un esfuerzo por reducir la contaminación del aire. En tanto que el etanol es prácticamente una alternativa al plomo, algunas refinerías han elegido al etanol como su sustituto, especialmente porque puede ser introducido fácilmente en el funcionamiento de una refinería sin una costosa inversión en bienes de capital.

[0005] Además de mejorar los procedimientos de sacarificación de gases a alta presión y alta temperatura desarrollados hace varias décadas, la investigación actual se dirige principalmente a procedimientos de conversión enzimática. Estos procedimientos emplean enzimas procedentes de una diversidad de organismos, como hongos, levaduras y bacterias mesófilos y termófilos, que degradan la celulosa en azúcares fermentables. En torno a estos procedimientos y a la posibilidad de su dimensionamiento a escala de comercialización aún existen ciertas incertidumbres, a lo que se añaden las tasas ineficaces de la producción de etanol.

[0006] La celulosa y la hemicelulosa son los materiales vegetales más abundantes producidos por fotosíntesis. Pueden degradarse para su uso como fuente energética por parte de numerosos microorganismos, entre ellos bacterias, levaduras y hongos, que producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar los sustratos poliméricos en azúcares monoméricos (Aro y col., 2001). A menudo los organismos son restrictivos en lo que respecta a los azúcares que usan, lo cual indica los azúcares que es mejor producir durante la conversión. Conforme se acercan los límites de los recursos no renovables, el potencial de celulosa que se convertirá en un recurso importante de energía renovable es enorme (Krishna y col., 2001). El uso eficaz de la celulosa a través de procedimientos biológicos es un enfoque que resolverá la escasez de alimentos, piensos y combustibles (Ohmiya y col., 1997).

[0007] Las celulasas son enzimas que hidrolizan la celulosa (uniones beta-1,4-glucano o beta-D-glucosídicas) con el resultado de la formación de glucosa, celobiosa, celooligosacáridos, y similares. Las celulasas se han dividido tradicionalmente en tres grandes clases: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) ("EG"), exoglucanasas o celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) ("CBH") y beta-glucosidasas ([beta]-D-glucósido-glucohidrolasa; EC 3.2.1.21) ("BG") (Knowles y col., 1987 y Shulein, 1988). Las endoglucanasas actúan principalmente en las partes amorfas de la fibra de celulosa, mientras que las celobiohidrolasas son capaces también de degradar la celulosa cristalina.

[0008] Se ha demostrado también que las celulasas son útiles en la degradación de biomasa de celulosa a etanol (en la que las celulasas degradan celulosa a glucosa y las levaduras u otros microbios fermentan además la glucosa en etanol), en el tratamiento de pulpa mecánica (Pere y col., 1996), para su uso como un aditivo en los piensos (documento WO-91/04.673) y en molienda de grano por vía húmeda. La sacarificación y fermentación separada es un procedimiento según el cual la celulosa presente en la biomasa, por ejemplo, en los residuos de la planta del maíz, se convierte en glucosa y posteriormente cepas de levaduras convierten la glucosa en etanol. La

sacarificación y fermentación simultánea es un procedimiento según el cual la celulosa presente en la biomasa, por ejemplo, en residuos de la planta del maíz, se convierte en glucosa y, al mismo tiempo y en el mismo reactor, cepas de levaduras convierten la glucosa en etanol. La producción de etanol a partir de fuentes fácilmente disponibles de celulosa proporciona una fuente de combustible estable y renovable.

5 **[0009]** Se sabe que las celulasas son producidas por un gran número de bacterias, levaduras y hongos. Determinados hongos producen un sistema de celulasa completo (es decir, una celulasa entera) capaz de degradar formas cristalinas de celulosa. Con el fin de convertir eficazmente celulosa cristalina en glucosa se requiere el sistema de celulasa completo que comprende componentes de cada una de las clasificaciones CBH, EG y BG, con componentes aislados menos eficaces en la hidrólisis de la celulosa cristalina (Filho y col., 1996). En particular, la
10 combinación de celulasas de tipo EG y celulasas de tipo CBH interacciona para degradar más eficazmente la celulosa que cualquier enzima usada en solitario (Wood, 1985; Baker y col., 1994; y Nieves y col., 1995).

[0010] Además, en la técnica se sabe que las celulasas son útiles en el tratamiento de material textil para el fin de mejorar la capacidad de limpieza de composiciones detergentes, para su uso como un agente de suavizado, para mejorar el tacto y la apariencia de los tejidos de algodón, y similares (Kumar y col., 1997). Se han descrito
15 composiciones detergentes que contienen celulasa con rendimiento de limpieza mejorado (patente de EE.UU. n° 4.435.307; solicitudes británicas n° 2.095.275 y 2.094.826) y para su uso en el tratamiento de telas para mejorar el tacto y la apariencia del material textil (patentes de EE.UU. n° 5.648.263, 5.691.178 y 5.776.757, y solicitud británica n° 1.358.599).

[0011] Por lo tanto, las celulasas producidas en hongos y bacterias han recibido una notable atención. En
20 particular, se ha demostrado que la fermentación de *Trichoderma spp.* (por ejemplo, *Trichoderma longibrachiatum* o *Trichoderma reesei*) produce un sistema de celulasa completo capaz de degradar formas cristalinas de celulosa. Con el paso de los años, la producción de celulasa de *Trichoderma* ha sido mejorada por mutagénesis clásica, cribado, selección y desarrollo de condiciones de fermentación económicas a gran escala y altamente refinadas. Mientras el sistema de celulasa de múltiples componentes de *Trichoderma spp.* es capaz de hidrolizar celulosa en
25 glucosa, existen celulasas de otros microorganismos, en particular cepas bacterianas, con diferentes propiedades para una hidrólisis eficaz de celulosa, y sería ventajoso expresar estas proteínas en un hongo filamentoso para producción de celulasa a escala industrial. Sin embargo, los resultados de muchos estudios demuestran que el rendimiento de enzimas bacterianas a partir de hongos filamentosos es bajo (Jeeves y col., 1991).

[0012] Los azúcares solubles, como la glucosa y la celobiosa, tienen multitud de usos en la industria para la
30 producción de productos químicos y biológicos. La optimización de la hidrólisis de celulosa permite el uso de cantidades menores de enzima y una rentabilidad económica mejorada para la producción de azúcares solubles. A pesar del desarrollo de numerosos planteamientos, sigue existiendo la necesidad en la técnica de mejorar el rendimiento de los azúcares solubles obtenidos de materiales celulósicos.

Tolan (Clean Tech Environ Policy, 2002, 339 – 345) desvela la visión general de un procedimiento para producir
35 etanol a partir de biomasa celulósica que incluye el uso de celulasa en una reacción de hidrólisis de celulosa. El material celulósico es procesado en la reacción de hidrólisis durante 5 a 7 días a 50 °C .

Vlikara y col. (Advances in Biochem. Engin./Biotechnol, 2007, 121 – 145) desvela una comparación de enzimas termoestables y celulasas comerciales en hidrólisis de lignocelulosa.

El documento WO-2005/001.065 desvela una variante CBH1.1 de *Humicola grisea* que tiene actividad de
40 celobiohidralasa.

5. RESUMEN

[0013] La presente invención proporciona procedimientos para aumentar el rendimiento de los azúcares solubles a partir de la sacarificación enzimática de materiales celulósicos de partida mediante incubación de un sustrato celulósico o un sustrato celulósico pretratado con una celulasa entera de *Trichoderma reesei* a una
45 temperatura de entre 50 °C y 65 °C durante 0,1 horas a 96 horas a un pH de 4 a 9. La presente invención proporciona también procedimientos para aumentar el rendimiento de glucosa a partir de la sacarificación enzimática de materiales celulósicos de partida mediante la incubación de un sustrato celulósico o un sustrato celulósico pretratado con una celulasa a una temperatura de o aproximadamente a la temperatura de desnaturalización térmica de la celulasa.

50 **[0014]** También se proporcionan procedimientos para convertir un material celulósico en glucosa mediante la combinación de un material celulósico con una celulasa incubando la combinación de material celulósico y celulasa a una temperatura superior a aproximadamente 38 °C para provocar una reacción de hidrólisis con el fin de convertir al menos el 20 % de dicho material celulósico en azúcares solubles, en el que la fracción de glucosa es al menos 0,75 con respecto a los azúcares solubles. La presente invención proporciona además procedimientos para convertir

un material celulósico en celobiosa combinando un material celulósico con mezcla de enzimas que comprenden una endoglucanasa 1, de manera que la incubación de la combinación de material celulósico y celulosa provoca una reacción de hidrólisis para convertir hasta el 50 % del material celulósico en azúcares solubles, en el que la fracción de glucosa es inferior a aproximadamente 0,5 con respecto a dichos azúcares solubles.

5 **[0015]** Las celulasas son celulasas enteras, mezclas de celulasas enteras o combinaciones de las mismas producidas por microorganismos a partir de especies de *Trichoderma reesei*.

[0016] En la presente memoria descriptiva se proporcionan estas y otras características de la presente invención.

6. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 **[0017]** El experto en la materia comprenderá que los dibujos se ofrecen solo con fines de ilustración y no pretenden limitar en ningún modo el ámbito de la presente invención.

[0018] Las figs. 1A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 3,3 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros).

15 **[0019]** Las figs. 2A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 12 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros).

[0020] Las figs. 3A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles por 18 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de
20 betaglucosidasa 1, 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros).

[0021] Las figs. 4A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 20 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros).

[0022] Las figs. 5A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en
25 azúcares solubles mediante 20 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros).

[0023] Las figs. 6A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 12 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei*, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros).

30 **[0024]** Las figs. 7A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 12 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* que expresa una proteína de fusión CBH1-E1, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros).

[0025] Las figs. 8A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 15 mg/g de una mezcla de enzimas de EG1 y CBH1 de *T. reesei* (cuadrados) o de E1 y
35 CBH1 de *H. grisea* (círculos) a 38 °C (símbolos huecos) y 65 °C (símbolos negros).

[0026] Las figs. 9A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 15 mg/g de una mezcla de enzimas de EG1, CBH1 de *T. reesei* y CBH2 de *T. reesei* (cuadrados) o de E1, CBH1 de *H. grisea* y CBH2 de *T. reesei* (círculos) a 38 °C (símbolos huecos) y 65 °C (símbolos negros).

40 **[0027]** Las figs. 10A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 15 mg/g de una mezcla de enzimas de EG1, CBH1 de *T. reesei* (cuadrados) y E3 de *T. fusca* o de E1, CBH1 de *H. grisea* y E3 de *T. fusca* (círculos) a 38 °C (símbolos huecos) y 65 °C (símbolos negros).

[0028] Las figs. 11A-F muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante una cepa de *Trichoderma reesei* a 53 °C (símbolos negros) y 59 °C (símbolos huecos).

45 **[0029]** Las figs. 12A-F muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante una celulasa entera de *Trichoderma reesei* que expresa una proteína de fusión CBH1-E1, a 53 °C (símbolos negros) y 59 °C (símbolos huecos).

7. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE VARIAS FORMAS DE REALIZACIÓN

[0030] Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entiende normalmente el experto en la materia a quien se dirige esta invención. Singleton, y col., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionan al experto un diccionario genérico de muchos de los términos usados en esta invención. Aunque puede usarse cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria descriptiva en la práctica o la prueba de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, los protocolos y los reactivos descritos en particular, ya que pueden variar.

[0031] Los encabezamientos proporcionados en la presente memoria descriptiva no son limitaciones de los diversos aspectos o formas de realización de la invención que pueden tomarse como referencia para la memoria descriptiva en su conjunto. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen de forma más completa con referencia a la memoria descriptiva tomada en su conjunto.

[0032] El término "celulasa" se refiere a una categoría de enzimas capaces de hidrolizar polímeros de celulosa (uniones beta-1,4-glucano o beta-D-glucosídicas) para acortar oligómeros de celooligosacáridos, celobiosa y/o glucosa.

[0033] El término "exo-celobiohidrolasa" (CBH) se refiere a un grupo de enzimas de celulasa clasificadas como EC 3.2.1.91. Estas enzimas son conocidas también como exoglucanasas o celobiohidrolasas. Las enzimas CBH hidrolizan la celobiosa a partir del extremo reductor o no reductor de la celulosa. En general, una enzima de tipo CBHI hidroliza preferentemente celobiosa a partir del extremo reductor de la celulosa y una enzima de tipo CBHII hidroliza preferentemente el extremo no reductor de la celulosa.

[0034] El término "actividad de celobiohidrolasa" se define en la presente memoria descriptiva como una actividad de 1,4-D-glucan-celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91) que cataliza la hidrólisis de uniones 1,4-beta-D-glucosídicas en celulosa, celotetrosa, o cualquier polímero que contenga glucosa ligada a beta-1,4, liberando celobiosa a partir de los extremos de la cadena. Para los fines de la presente invención, la actividad de celobiohidrolasa puede determinarse mediante liberación de un azúcar reductor hidrosoluble de celulosa según se mide mediante el procedimiento PHBAH de Lever y col., 1972, *Anal. Biochem.* 47: 273 – 279. Puede establecerse una distinción entre el modo de ataque a exoglucanasa de una celobiohidrolasa y modo de ataque a endoglucanasa realizado por una medida similar de liberación de azúcar reductor a partir de celulosa sustituida como carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa (Ghose, 1987, *Pure & Appl. Chem.* 59: 257 – 268). Una celobiohidrolasa verdadera tendrá un índice de actividad muy elevado en celulosa no sustituida frente a la sustituida (Bailey y col., 1993, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 65 – 76).

[0035] El término "endoglucanasa" (EG) se refiere a un grupo de enzimas de celulasa clasificadas como EC 3.2.1.4. Una enzima de EG hidroliza enlaces beta-1,4-glucosídicos internos de la celulosa. El término "endoglucanasa" se define en la presente memoria descriptiva como una endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucan-4-glucanohidrolasa (E.C. nº 3.2.1.4) que cataliza la endohidrólisis de uniones 1,4-beta-D-glucosídicas en celulosa, derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3-glucanos mixtos como beta-D-glucanos o xiloglucanos de cereales, y otro material vegetal que contiene componentes celulósicos. Para los fines de la presente invención, la actividad de endoglucanasa puede determinarse usando hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem.* 59: 257 – 268.

[0036] El término "beta-glucosidasa" se define en la presente memoria descriptiva como una beta-D-glucósido-glucohidrolasa (E.C. 3,2,1,21) que cataliza la hidrólisis de celobiosa con la liberación de beta-D-glucosa. Para los fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, HPLC.

[0037] La "actividad celulolítica" comprende la actividad de exoglucanasa, la actividad de endoglucanasa o la actividad de ambos tipos de enzimas, así como la actividad de beta-glucosidasa.

[0038] Muchos microbios fabrican enzimas que hidrolizan la celulosa, entre ellos las bacterias *Acidothermus*, *Thermobifida*, *Bacillus* y *Cellulomonas*; *Streptomyces*; levaduras como *Candida*, *Cluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia* y los hongos *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobosidium*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paeclomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* o *Trichoderma*, o formas sexuales alternativas de los mismos como *Emericella* e *Hypocrea* (véase Kuhls y col., 1996).

[0039] Una composición "de ocurrencia no natural" comprende aquellas composiciones producidas por: (1) combinación de enzimas celulolíticas de componentes ya sea en una proporción de ocurrencia natural o en una proporción de ocurrencia no natural, es decir, alterada; o (2) modificación de un organismo para expresar en exceso o en defecto una o más enzimas celulolíticas; o (3) modificación de un organismo de tal manera que se suprima al menos una enzima celulolítica o (4) modificación de un organismo para expresar una enzima celulolítica de componente heterólogo. Las enzimas celulolíticas de componentes pueden proporcionarse como polipéptidos aislados antes de la combinación para formar la composición de ocurrencia no natural.

[0040] Los autores de la invención han encontrado, en parte, que el aumento en la temperatura de sacarificación aumenta el rendimiento de glucosa a partir de materiales celulósicos y también da como resultado una mejora en la conversión global de celulosa de tal manera que la fracción de glucosa en el producto de conversión aumenta a temperaturas de incubación más elevadas.

[0041] La presente invención proporciona procedimientos para aumentar el rendimiento de azúcares solubles a partir de la sacarificación enzimática de materiales celulósicos de partida mediante incubación de un sustrato celulósico o un sustrato celulósico pretratado con una celulasa entera de *Trichoderma reesei* a una temperatura entre 50 °C y 65 °C durante 0,1 horas a 96 horas a un pH de 4 a 9. La presente invención proporciona además procedimientos para aumentar el rendimiento de glucosa a partir de la sacarificación enzimática de materiales celulósicos de partida mediante incubación de un sustrato celulósico o un sustrato celulósico pretratado con una celulasa entera de *Trichoderma reesei* entre 50 °C y 65 °C durante 0,1 horas a 96 horas a un pH de 4 a 9.

[0042] En los procedimientos de la presente descripción, el material celulósico puede ser cualquier material que contenga celulosa. El material celulósico puede incluir, pero no se limita a, celulosa, hemicelulosa y materiales lignocelulósicos. En algunas formas de realización, los materiales celulósicos incluyen, pero no se limitan a, biomasa, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, residuos de papel, y residuos de pulpa y papel. En algunas formas de realización, el material celulósico incluye madera, pulpa de madera, lodos de fabricación de papel, flujos de residuos de pulpa de papel, madera aglomerada, residuos de la planta del maíz, fibra de maíz, arroz, residuos del procesamiento de papel y pulpa, plantas leñosas o herbáceas, pulpa de la fruta, pulpa vegetal, piedra pómez, grano de destiladoras, hierbas, cáscaras de arroz, bagazo de caña de azúcar, algodón, yute, cáñamo, lino, bambú, sisal, abacá, paja, mazorcas de maíz, granos de destiladoras, hojas, paja de trigo, residuos de coco, algas, pasto varilla y mezclas de los mismos (véase, por ejemplo, Wiselogel y col., 1995, en Handbook on Bioetanol (Charles E. Wyman, editor), pág. 105 – 118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3 – 16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695 – 719; Mosier y col., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, director editorial, Volumen 65, pág. 23 – 40, Springer-Verlag, Nueva York).

[0043] El material celulósico puede usarse tal cual o puede someterse a pretratamiento usando procedimientos conocidos en la técnica. Dichos pretratamientos incluyen pretratamiento químico, físico y biológico. Por ejemplo, las técnicas de pretratamiento físico pueden incluir sin limitación diversos tipos de molienda, trituración, inyección de vapor/explosión de vapor, irradiación e hidrotérmolisis. Las técnicas de pretratamiento químico pueden incluir sin limitación ácido diluido, tratamiento alcalino, disolvente orgánico, amoniaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono e hidrotérmolisis controlada por pH. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden incluir sin limitación aplicación de microorganismos solubilizadores de lignina. El pretratamiento puede tener lugar desde varios minutos a varias horas, por ejemplo, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 120.

[0044] En una forma de realización, el pretratamiento puede realizarse a temperatura elevada y con la adición de ácido diluido, ácido concentrado o solución alcalina diluida. La solución de pretratamiento puede añadirse durante un tiempo suficiente para hidrolizar al menos parcialmente los componentes de hemicelulosa y a continuación neutralizarlos.

[0045] En algunas formas de realización, el pretratamiento se selecciona a partir de un grupo que consiste en explosión de vapor, reducción a pulpa, molturación, hidrólisis ácida y combinaciones de las mismas.

[0046] La celulasa entera se hace reaccionar con el material celulósico a una temperatura entre 50 °C y 65 °C. El pH está entre pH 4, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0 y aproximadamente pH 8,5. Generalmente, el intervalo de pH estará entre aproximadamente pH 4,5 y pH 9. La incubación de la celulasa en estas condiciones produce la liberación o producción de cantidades sustanciales del azúcar soluble a partir del material celulósico. Por cantidades sustanciales se entiende que al menos el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más de azúcar soluble es azúcar disponible.

[0047] El tratamiento de celulosa dura entre 0,1 horas y 96 horas, preferentemente de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 72 horas, más preferentemente de aproximadamente 24 a 48 horas.

[0048] La cantidad de celulasa depende de la(s) enzima(s) aplicada(s) y del tiempo y las condiciones de reacción dados. Preferentemente, la(s) celulasa(s) puede(n) dosificarse en una cantidad total de aproximadamente 2 a 40 mg/g de material celulósico.

[0049] En los procedimientos de la presente descripción, la celulasa puede ser celulasa entera, una celulasa entera suplementada con una o más actividades de enzimas y una mezcla de celulastas. En algunas formas de realización, la celulasa puede ser una preparación de celulasa entera. Según se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "preparación de celulasa entera" se refiere a composiciones que contienen celulasa de ocurrencia natural y de ocurrencia no natural. Una composición "de ocurrencia natural" es la producida por una fuente de ocurrencia natural y que comprende uno o más componentes de tipo celobiohidrolasa, uno o más componentes de tipo endoglucanasa y uno o más componentes de beta-glucosidasa en la que cada uno de estos componentes está presente en la proporción producida por la fuente. Una composición de ocurrencia natural es aquella producida por un organismo no modificado con respecto a las enzimas celulolíticas de manera que la proporción entre las enzimas componentes no está alterada con respecto a la producida por el organismo nativo.

[0050] En general, las celulastas pueden incluir, pero no se limitan a: (i) endoglucanasas (EG) o 1,4-β-d-glucan-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), (ii) exoglucanasas, que incluyen 1,4-β-d-glucan-glucanohidrolasas (también conocidas como celodextrinasas) (EC 3.2.1.74) y 1,4-β-d-glucan-celobiohidrolasas (exo-celobiohidrolasas, CBH) (EC 3.2.1.91), y (iii) β-glucosidasa (BG) o β-glicósido-glucohidrolasas (EC 3.2.1.21).

[0051] La celulasa entera es una celulasa entera de *Trichoderma reesei*, como RL-P37 (Sheir-Neiss y col., Appl. Microbiol. Biotechnology, 20 (1984), pág. 46 – 53).

[0052] En algunas formas de realización, la celulasa es una celulasa entera RutC30 de *Trichoderma reesei*, que está disponible en la American Type Culture Collection como *Trichoderma reesei* ATCC 56765.

[0053] En la presente descripción, la celulasa puede provenir de cualquier procedimiento de cultivo conocido en la técnica que da como resultado la expresión de enzimas capaces de hidrolizar un material celulósico. La fermentación puede incluir cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña o gran escala, como fermentaciones continuas, por lotes, discontinuas o en estado sólido en fermentadores de laboratorio o industriales realizadas en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión o el aislamiento de la celulasa.

[0054] Generalmente, el microorganismo se cultiva en un medio de cultivo celular adecuado para producción de enzimas capaces de hidrolizar un material celulósico. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios de cultivo adecuados, los intervalos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y producción de celulasa son conocidos en la técnica. Como ejemplo no limitativo, el intervalo normal de temperatura para la producción de celulastas por *Trichoderma reesei* es de 24 °C a 28 °C .

[0055] Algunos hongos producen sistemas de celulasa completos que incluyen exo-celobiohidrolasas o celulastas de tipo CBH, endoglucanasas o celulastas de tipo EG y beta-glucosidasas o celulastas de tipo BG (Schulein, 1988). Sin embargo, a veces estos sistemas carecen de celulastas de tipo CBH, por ejemplo, las celulastas bacterianas incluyen también normalmente pocas o ninguna celulasa de tipo CBH. Además, se ha mostrado que los componentes EG y los componentes CBH interaccionan sinérgicamente para degradar más eficazmente la celulosa. Véase, por ejemplo, Wood, 1985. Los diferentes componentes, es decir, las diversas endoglucanasas y exocelobiohidrolasas en un sistema de celulastas completo o de componentes múltiples, tienen generalmente diferentes propiedades, como punto isoeléctrico, peso molecular, grado de glucosilación, especificidad de sustrato y patrones de acción enzimática.

[0056] En algunas formas de realización, la celulasa se usa tal como se produce por fermentación con recuperación y/o purificación ausente o mínima. Por ejemplo, una vez secretadas las celulastas por una célula en el medio de cultivo celular, puede usarse el medio de cultivo celular que contiene las celulastas. En algunas formas de realización la preparación de celulasa entera comprende el contenido no fraccionado del material de fermentación, que incluye medio de cultivo celular, enzimas extracelulares y células. Alternativamente, la preparación de celulasa entera puede procesarse mediante cualquier procedimiento conveniente, por ejemplo, por precipitación, centrifugación, afinidad, filtración o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. En algunas formas de realización, la preparación de celulasa entera puede concentrarse, por ejemplo, y a continuación usarse sin purificación adicional. En algunas formas de realización la preparación de celulasa entera comprende agentes químicos que disminuyen la viabilidad celular o destruyen las células. En algunas formas de realización, las células se someten a lisis o permeabilización usando procedimientos conocidos en la técnica.

[0057] Una celulasa que contenga una cantidad mejorada de celobiohidrolasa y/o beta-glucosidasa encuentra utilidad en la producción de etanol. El etanol de este procedimiento puede usarse además como un potenciador de octanos o directamente como combustible en lugar de la gasolina, lo que resulta ventajoso porque el etanol como

fuerza de combustible es más respetuoso ambientalmente que los productos derivados del petróleo. Se sabe que el uso de etanol mejorará la calidad del aire y posiblemente reducirá los niveles de ozono locales y la niebla contaminante. Por otra parte, el uso de etanol en lugar de gasolina puede ser de importancia estratégica para amortiguar el impacto de los cambios súbitos en los suministros de energías no renovables y petroquímicos.

5 **[0058]** El etanol puede producirse por medio de procedimientos de sacarificación y fermentación a partir de biomasa celulósica como árboles, plantas herbáceas, residuos sólidos municipales y residuos agrícolas y forestales. Sin embargo, la proporción de enzimas individuales de celulasa dentro de una mezcla de celulasa de ocurrencia natural producida por un microbio puede no ser la más eficaz para la conversión rápida de celulosa de biomasa a glucosa. Se sabe que las endoglucanasas actúan para producir nuevos extremos de cadena de celulosa que en sí
10 son sustratos para la acción de celobiohidrolasas y, con ello, mejoran la eficacia de la hidrólisis por parte del sistema de celulasa entera. Por tanto, el uso de una actividad aumentada u optimizada de celobiohidrolasa puede mejorar enormemente la producción de etanol.

[0059] El etanol puede producirse por degradación enzimática de biomasa y conversión de los sacáridos liberados en etanol. Esta clase de etanol recibe a menudo el nombre de bioetanol o biocombustible. Puede usarse
15 como aditivo o diluyente en combustibles en mezclas de menos del 1 % y hasta el 100 % (un combustible sustitutivo).

[0060] Puede lograrse una conversión mejorada de celulosa a temperaturas superiores usando los polipéptidos CBH descritos, por ejemplo, en una cualquiera de las siguientes publicaciones de patentes de EE.UU. US-2005/0.054.039, US-2005/00-37.459, US-2006/0.205.042, US-2005/0.048.619-A1 y US-2006/0.218.671. Los
20 procedimientos de expresión en exceso de beta-glucosidasa son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento US-6.022.725. Véase también, por ejemplo, el documento US-2005/0.214.920.

[0061] En algunas formas de realización, la celulasa es una proteína de fusión de exocelobiohidrolasa.

[0062] En algunas formas de realización, la mezcla de celulasa comprende una celulasa seleccionada entre endoglucanasa 1 (EG1) de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa 1 (CBH1) de *Trichoderma reesei* y celobiohidrolasa
25 2 (CBH2) de *Trichoderma reesei*, y combinaciones de las mismas.

[0063] Los procedimientos de la presente descripción pueden usarse en la producción de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como materias primas químicas de fermentación para microorganismos, e inductores para la producción de proteínas, productos orgánicos, productos químicos y combustibles, plásticos y otros productos y productos intermedios. En particular, el valor del procesamiento de residuos (granos de destiladoras desecados, granos perdidos en elaboración de cerveza, bagazo de caña de azúcar, etc.) puede incrementarse mediante solubilización parcial o completa de celulosa o hemicelulosa. Además de etanol, algunos productos químicos que pueden producirse a partir de celulosa y hemicelulosa incluyen acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido láctico), 1,3-propanodiol, butanodiol, glicerol, etilenglicol, furfural, polihidroxialcanoatos, ácido cis, cis-mucónico, pienso animal y xilosa.

35 **[0064]** La presente invención proporciona procedimientos según se desvela anteriormente para convertir un material celulósico en glucosa que comprende la combinación de un material celulósico con una celulasa, la incubación de dicha combinación de material celulósico y celulasa, para provocar una reacción de hidrólisis con el fin de convertir material celulósico en azúcares solubles, en los que dichos azúcares solubles comprenden glucosa y celobiosa y la fracción de glucosa es de al menos 0,75 con respecto a dichos azúcares solubles.

40 **[0065]** La presente invención proporciona además procedimientos según se ha desvelado anteriormente para convertir un material celulósico en celobiosa, que comprende la combinación de un material celulósico con una mezcla de celulasa que comprende una endoglucanasa 1.

[0066] En algunas formas de realización, los procedimientos de la presente descripción comprenden además la etapa de determinar la cantidad de glucosa y/o azúcares solubles.

45 **[0067]** También se proporcionan procedimientos según se ha desvelado anteriormente para convertir un material celulósico en glucosa que comprenden las etapas de combinación de un material celulósico con una celulasa de tal manera que la combinación resultante de material celulósico y celulasa tiene del 1 % a aproximadamente el 30 % celulosa en peso.

[0068] En la presente memoria descriptiva se proporcionan procedimientos según se ha desvelado
50 anteriormente para convertir un material celulósico en celobiosa que comprenden las etapas de combinación de un material celulósico con una mezcla de celulasa que comprende una endoglucanasa 1.

[0069] La presente invención se describe en mayor detalle en los siguientes ejemplos, que en ningún modo

pretenden limitar el ámbito de la invención según las reivindicaciones. Las figuras adjuntas deben considerarse partes integrales de la memoria descriptiva y de la descripción de la invención.

[0070] Los aspectos de la presente invención pueden comprenderse adicionalmente a la luz de los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitativos del ámbito de la presente invención.

5 7. EJEMPLOS

[0071] Se evaluó la conversión de celulosa mediante técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Baker y col., Appl Biochem Biotechnol 70 – 72: 395 – 403 (1998) y según se describe anteriormente. Se cargaron 150 microlitros de sustrato por pocillo en una placa de microtitulación (MTP) de 96 pocillos de base plana usando una pipeta repetidora. Se añadieron sobre ellos 20 microlitros de solución enzimática adecuadamente diluida. Se cubrieron las placas con elementos de sellado de placas de aluminio y se colocaron en incubadoras a las 10 temperaturas de ensayo, con agitación, durante los tiempos especificados. Se terminó la reacción añadiendo 100 µl de glicina 100 mM pH 10 a cada pocillo. Con un mezclado minucioso, se filtró el contenido de los mismos a través de una placa con filtro de 96 pocillos Millipore (0,45 µm, PES). Se diluyó el filtrado en una placa que contenía 100 µl de glicina 10 mM pH 10 y se midió la cantidad de azúcares solubles producidos por HPLC. Los elementos de HPLC de 15 serie Agilent 1100 estaban todos equipados con una columna de protección/extracción de cenizas (Biorad #125-0118) y una columna de hidratos de carbono con base de plomo Aminex (Aminex HPX-87P). La fase móvil fue agua con una velocidad de flujo de 0,6 ml/min.

[0072] Residuos de la planta del maíz pretratados (PCS). Se sometieron a pretratamiento residuos de la planta del maíz con H₂SO₄ al 2 % p/p según se describe en Schell, D. y col., J. Appl. Biochem. Biotechnol. 105: 69 – 86 (2003) y se siguió de múltiples lavados con agua desionizada para obtener un pH de 4,5. Se añadió acetato de sodio para obtener una concentración final de 50 mM y se trató la solución a pH 5,0. La concentración de celulosa en la mezcla de reacción fue de aproximadamente el 7 %.

[0073] Usando las siguientes celulasas: celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de beta-glucosidasa 1 (WC-BGL1) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.022.725), celulasa entera de 25 *Trichoderma reesei* que expresa una proteína de fusión CBH1-E1 (WC-CBH1-E1) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° de publicación 2006 – 0.057.672), Endoglucanasa 1 (EG1) de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa 1 (CBH1) de *Trichoderma reesei* y celobiohidrolasa 2 (CBH2) de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa 1 (CBH1) de *Humicola grisea* y endoglucanasa E1 (E1) de *Acidothermus cellulolyticus*, exocelulasa E3 de *Thermomonospora fusca*. La cantidad de enzima se proporcionó en miligramos por gramo de celulosa. Los resultados se resumen en 30 las figs. 1 – 12. La ordenada representa la fracción de glucosa con respecto al azúcar total (base p/p). Por ejemplo, en la fig. 1 – 10, (A) la ordenada representa la duración del tiempo de conversión y en la fig. 1 – 10, (B) la abscisa representa la conversión de azúcar soluble total que se observa (no se han indicado explícitamente todos los tiempos de incubación, pero un tiempo de incubación posterior se indica mediante mayor conversión).

[0074] Las figs. 1A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en 35 azúcares solubles mediante 3,3 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros). La celulasa entera de *T. reesei* con niveles elevados de β-glucosidasa convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a 53 °C que a 38 °C .

[0075] Las figs. 2A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en 40 azúcares solubles mediante 12 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros). La celulasa entera de *T. reesei* con niveles elevados de β-glucosidasa convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a 53 °C que a 38 °C .

[0076] Las figs. 3A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en 45 azúcares solubles mediante 18 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros). La celulasa entera de *T. reesei* con niveles elevados de β-glucosidasa convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a 53 °C que a 38 °C .

[0077] Las figs. 4A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en 50 azúcares solubles mediante 20 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa 1 a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros). La celulasa entera de *T. reesei* con niveles elevados de β-glucosidasa convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a 53 °C que a 38 °C .

[0078] Las figs. 5A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en

azúcares solubles mediante 25 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* con expresión en exceso de betaglucosidasa, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros). La celulasa entera de *T. reesei* con niveles elevados de β -glucosidasa convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a 53 °C que a 38 °C .

5 **[0079]** Las figs. 6A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 12 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei*, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros). La celulasa entera de *T. reesei* convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a 53 °C que a 38 °C .

10 **[0080]** Las figs. 7A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 12 mg/g de celulasa entera de *Trichoderma reesei* que expresa una proteína de fusión CBH1-E1, a 38 °C (símbolos huecos) y 53 °C (símbolos negros). La celulasa entera de *T. reesei* convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a 53 °C que a 38 °C .

15 **[0081]** Las figs. 8A-B muestra la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 15 mg/g de una mezcla de celulasas compuesta por EG1 de *T. reesei* y CBH1 de *T. reesei* (cuadrados) o por E1 y CBH1 de *H. grisea* (círculos) a 38 °C (símbolos huecos) y 65 °C (símbolos negros). Las mezclas de celulasas que contienen E1 convierten los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de celobiosa superior que las mezclas que contienen EG1.

20 **[0082]** Las figs. 9A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 15 mg/g de una mezcla de celulasas compuesta por EG1, CBH1 de *T. reesei* y CBH2 de *T. reesei* (cuadrados) o por E1, CBH1 de *H. grisea* y CBH2 de *T. reesei* (círculos) a 38 °C (símbolos huecos) y 65 °C (símbolos negros). Las mezclas de celulasas que contienen E1 convierten los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de celobiosa superior que las mezclas que contienen EG1.

25 **[0083]** Las figs. 10A-B muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante 15 mg/g de una mezcla de celulasas compuesta por EG1, CBH1 de *T. reesei* y E3 de *T. fusca* (cuadrados) o por E1, CBH1 de *H. grisea* y E3 de *T. fusca* (círculos) a 38 °C (símbolos huecos) y 65 °C (símbolos negros). Las mezclas de celulasas que contienen E1 convierten los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de celobiosa superior que las mezclas que contienen EG1.

30 **[0084]** Las figs. 11A-F muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante celulasa entera de *Trichoderma reesei* a 53 °C (símbolos negros) y 59 °C (símbolos huecos) durante 1 día (A y B), 2 días (C y D) y 3 días (E y F). La ordenada representa la fracción de glucosa con respecto al azúcar total (base p/p) (A, B y E). La abscisa representa la dosis de enzima usada (B, D y E). La abscisa representa la conversión de azúcar soluble total que se observa (no se indican explícitamente todas las dosis, pero una dosis mayor está indicada por una conversión superior). La celulasa entera de *T. reesei* convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a altas temperaturas.

35 **[0085]** Las figs. 12A-F muestran la conversión de residuos de la planta del maíz tratados con ácido diluido en azúcares solubles mediante una celulasa entera de *Trichoderma reesei* que expresa una proteína de fusión CBH1-E1, a 53 °C (símbolos negros) y 59 °C (símbolos huecos) durante (A y B) 1, (C y D) 2 y (E y F) 3 días. La ordenada representa la fracción de glucosa con respecto al azúcar total (base p/p) (A, C y E). La abscisa representa la dosis de enzima usada (B, D y F). La abscisa representa la conversión de azúcar soluble total que se observa (no se indican explícitamente todas las dosis, pero una dosis mayor está indicada por una conversión superior). La celulosa entera de *T. reesei* convierte los residuos de la planta del maíz pretratados con ácido en una fracción de glucosa superior a altas temperaturas.

40 **[0086]** Debe entenderse que los ejemplos y formas de realización descritos en la presente memoria descriptiva se ofrecen solo con fines ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para convertir un material celulósico en glucosa que comprende las etapas de:
combinación de un material celulósico con una celulasa entera de *Trichoderma reesei* de tal manera que la combinación resultante de material celulósico y celulasa presenta del 1 % al 30 % de celulosa en peso; e
- 5 incubación de dicha combinación de material celulósico y celulasa a una temperatura entre 50 °C y 65 °C durante 0,1 horas a 96 horas a un pH de 4 a 9 para provocar una reacción de hidrólisis con el fin de convertir al menos el 20 % de dicho material celulósico en azúcares solubles,
en el que dichos azúcares solubles comprenden glucosa y celobiosa, y la fracción de glucosa es de al menos 0,75 con respecto a dichos azúcares solubles y el rendimiento de glucosa aumenta a temperaturas de incubación superiores a 50 °C en comparación con el rendimiento de glucosa a una temperatura de incubación de 38 °C .
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho *Trichoderma reesei* expresa una enzima recombinante.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha enzima recombinante es una beta-glucosidasa.
- 15 4. Un procedimiento para convertir un material celulósico en celobiosa que comprende las etapas de:
combinación de un material celulósico con una mezcla de celulasa entera de *Trichoderma reesei* que comprende una endoglucanasa 1 de tal manera que la combinación resultante de mezcla de material celulósico y celulasa presenta del 1 % al 30 % de celulosa en peso; e
incubación de dicha combinación de material celulósico y celulasa a una temperatura entre 50 °C y 65 °C durante
- 20 0,1 horas a 96 horas a un pH de 4 a 9 para provocar una reacción de hidrólisis con el fin de convertir hasta el 50 % de dicho material celulósico en azúcares solubles, en el que dichos azúcares solubles comprenden glucosa y celobiosa y la fracción de glucosa es inferior a 0,5 con respecto a dichos azúcares solubles y el rendimiento de glucosa aumenta a temperaturas de incubación superiores a 50 °C en comparación con el rendimiento de glucosa a una temperatura de incubación de 38 °C .
- 25 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material celulósico se selecciona entre el grupo que consiste en cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, residuos de jardinería, madera, residuos forestales, pasto varilla, residuos de papel, lodos de fabricación de papel, grano de maíz, mazorcas de maíz, hojas de maíz, residuos de la planta del maíz, hierbas, trigo, paja de trigo, heno, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, árboles, cebada y
- 30 paja de cebada.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además el pretratamiento de dicho material celulósico.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho pretratamiento se selecciona a partir de un grupo que consiste en explosión de vapor, reducción a pulpa, molturación, hidrólisis ácida y combinaciones de las
- 35 mismas.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además la determinación de la cantidad de glucosa.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además la determinación de la cantidad de azúcares solubles.
- 40 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cantidad de dicha mezcla de celulasa es aproximadamente de 2 mg a 40 mg/g de material celulósico.
11. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha mezcla de celulasa comprende además una celobiohidrolasa 1.
12. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha mezcla de celulasa comprende además
- 45 una celobiohidrolasa 2.
13. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha mezcla de celulasa comprende además E3 de *Thermomonospora fusca*.

FIG. 1(B)

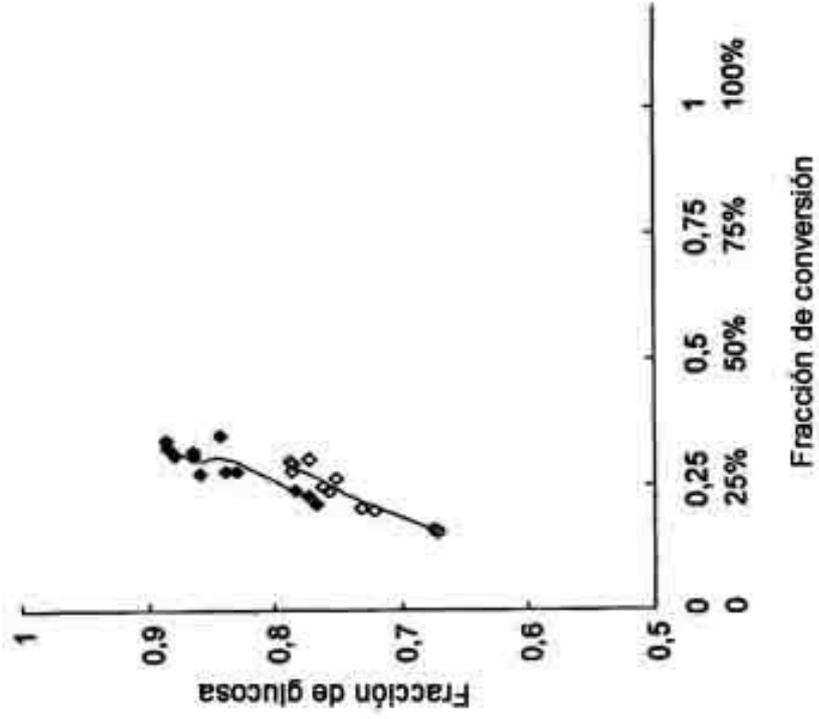


FIG. 1(A)

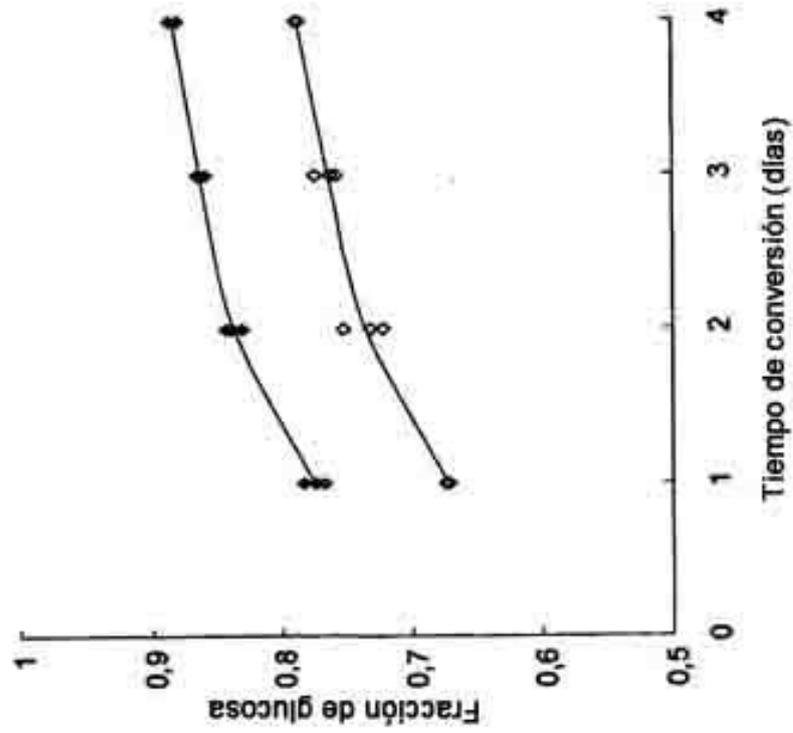


FIG. 2(B)

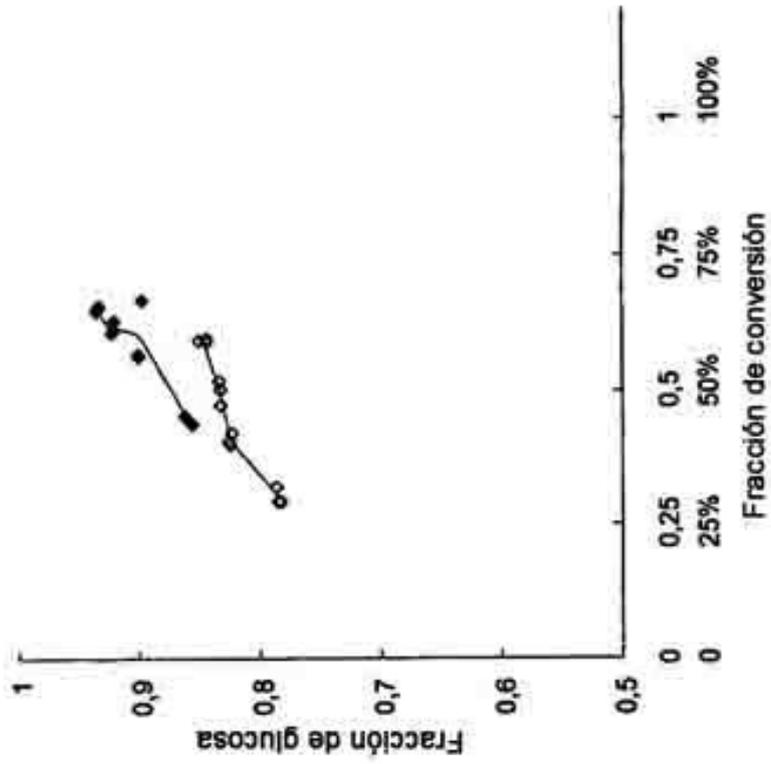


FIG. 2(A)

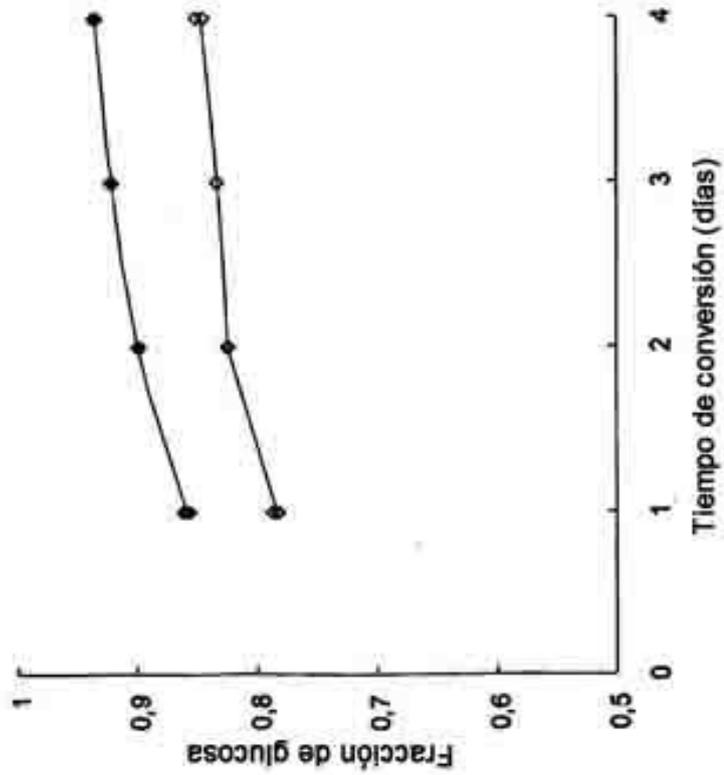


FIG. 3(B)

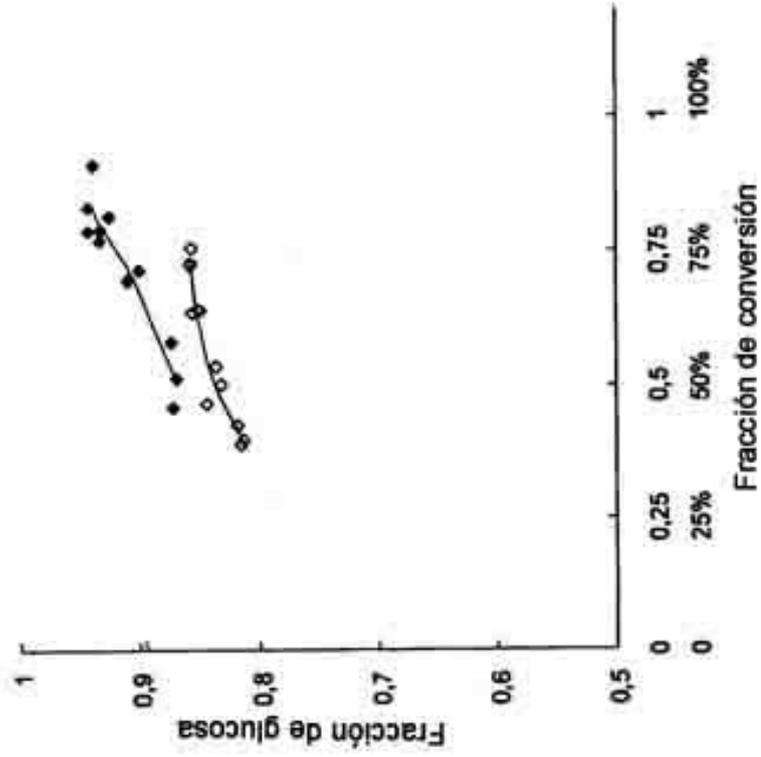


FIG. 3(A)

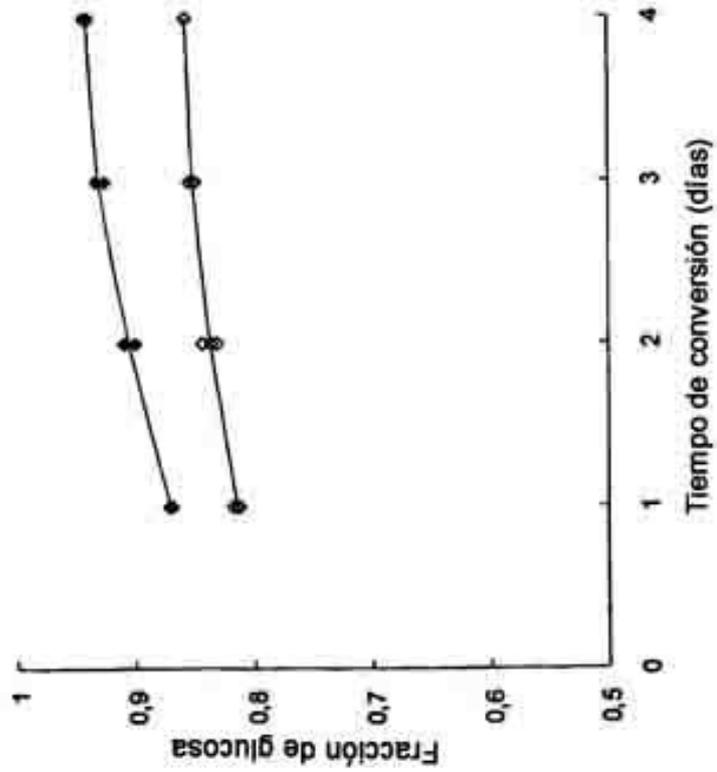


FIG. 4(A)

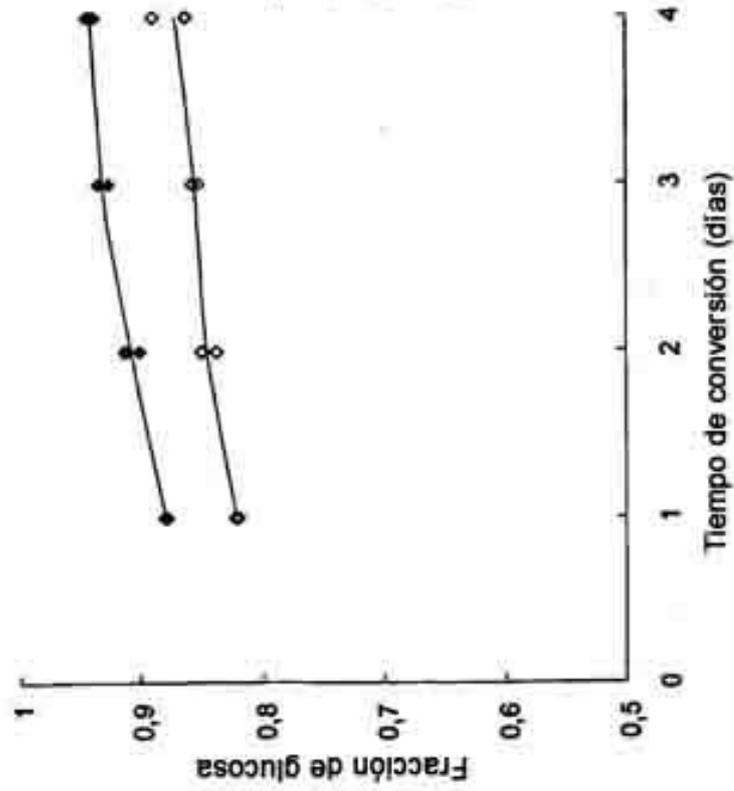


FIG. 4(B)

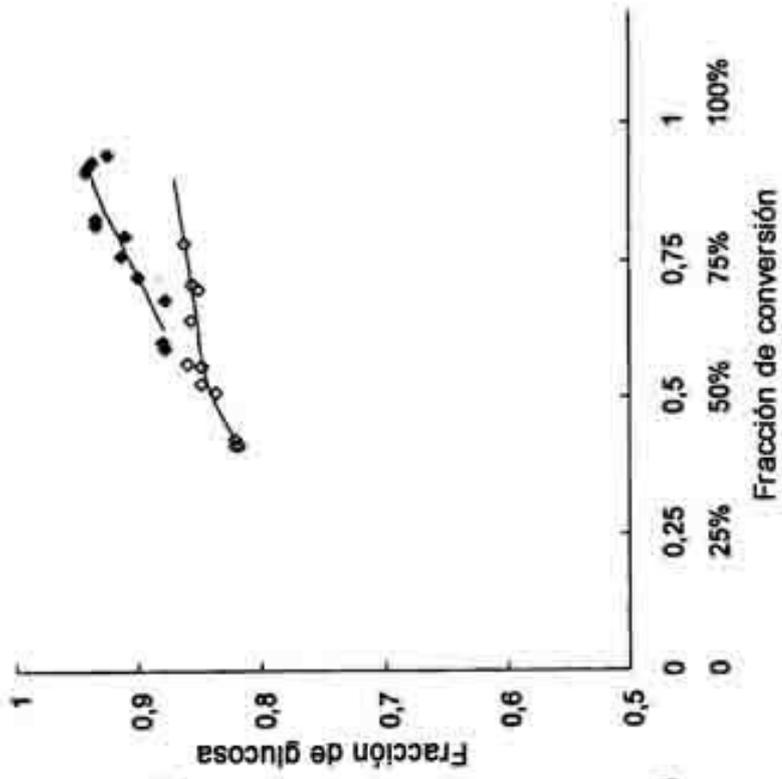


FIG. 5(B)

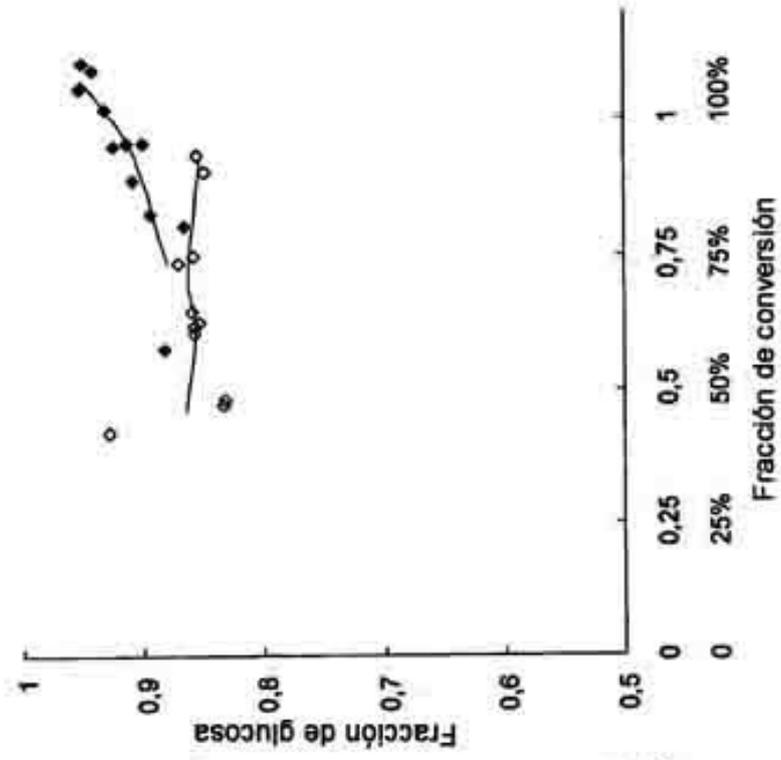


FIG. 5(A)

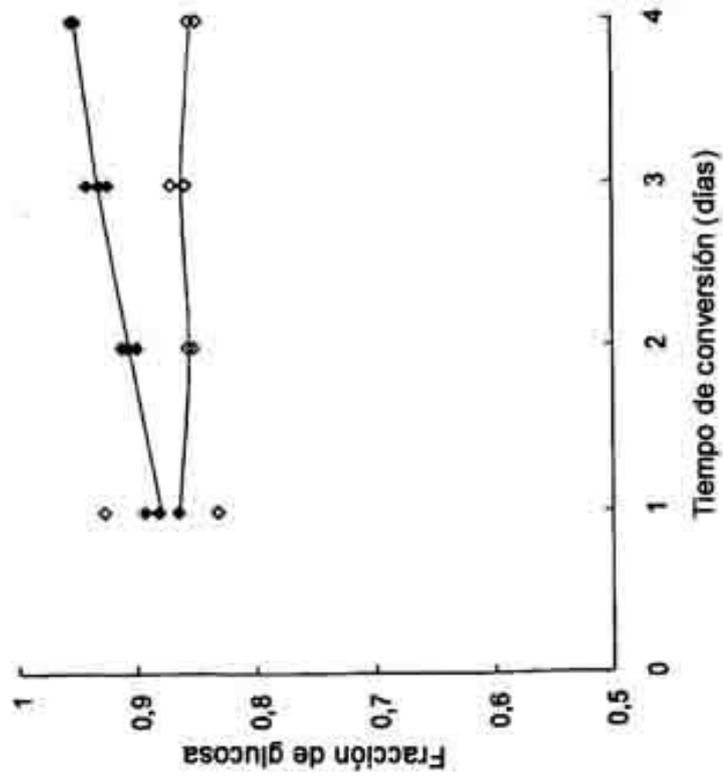


FIG. 6(B)

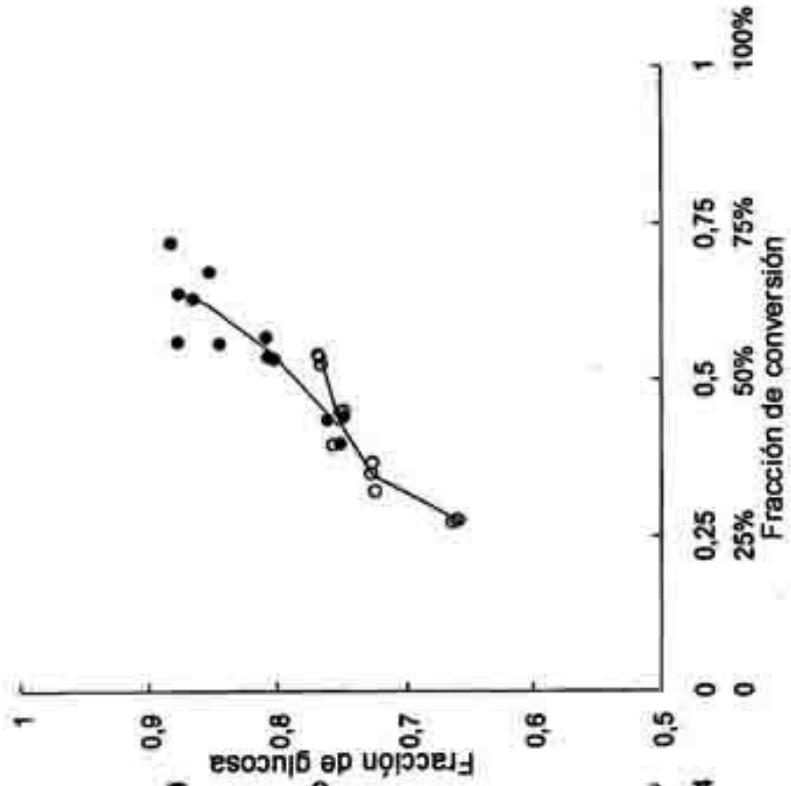


FIG. 6(A)

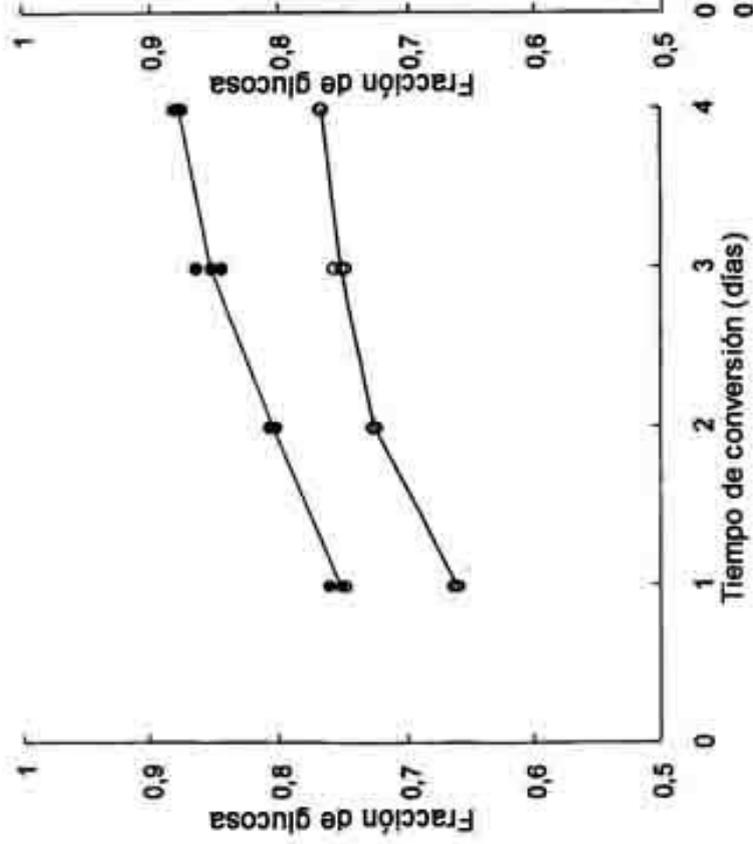


FIG. 7(B)

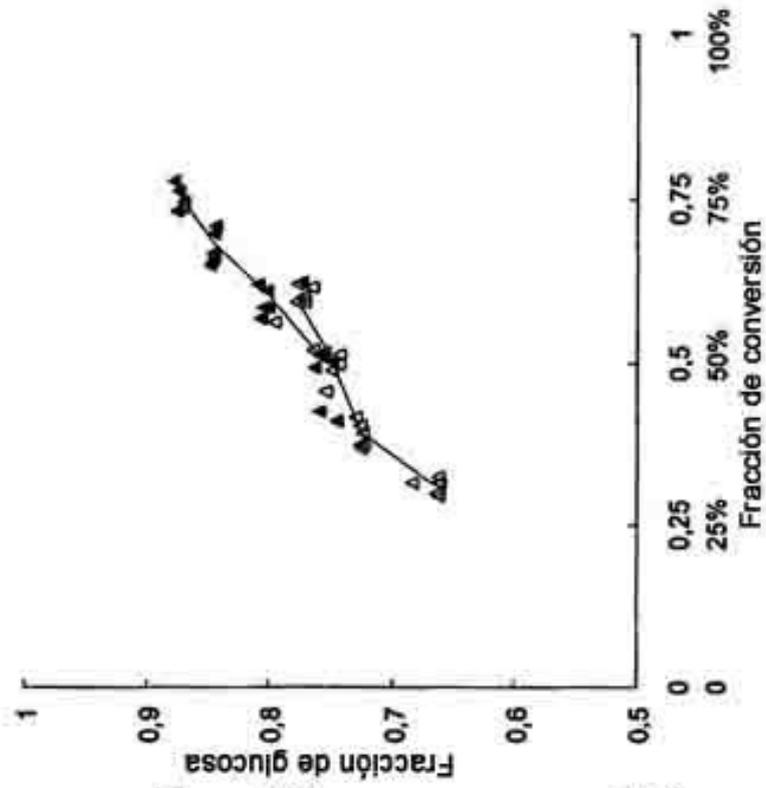


FIG. 7(A)

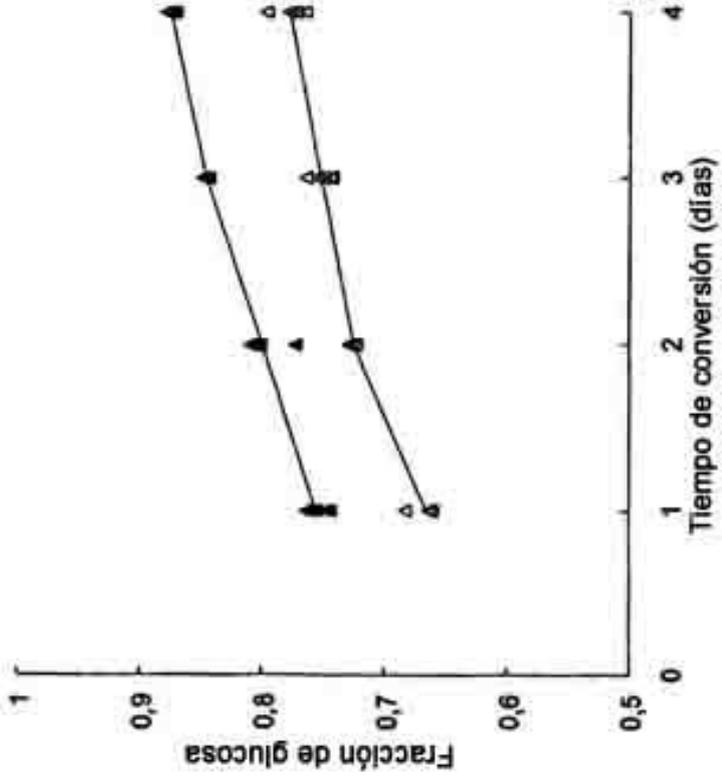


FIG. 8(B)

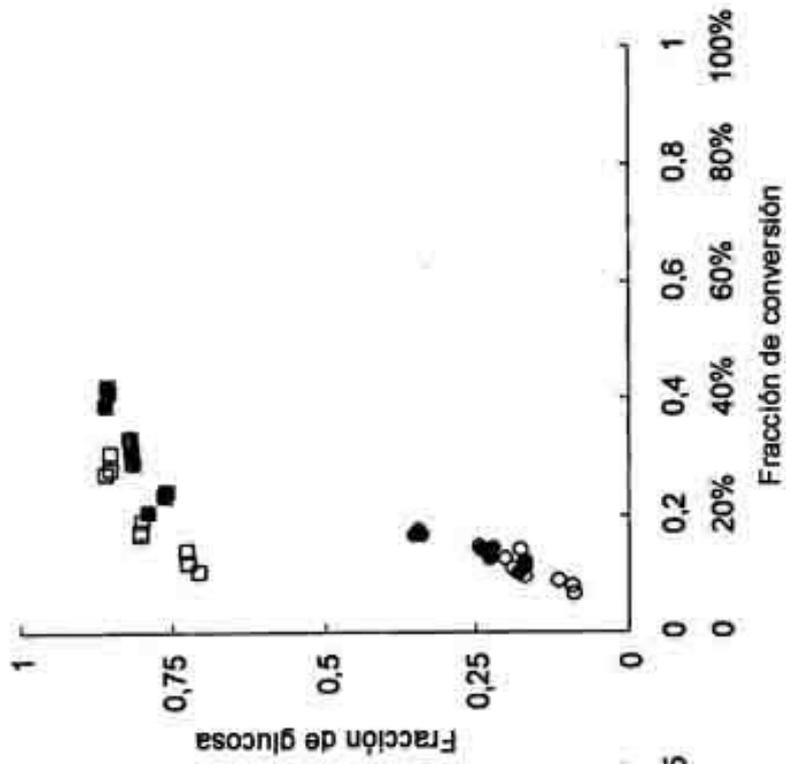


FIG. 8(A)

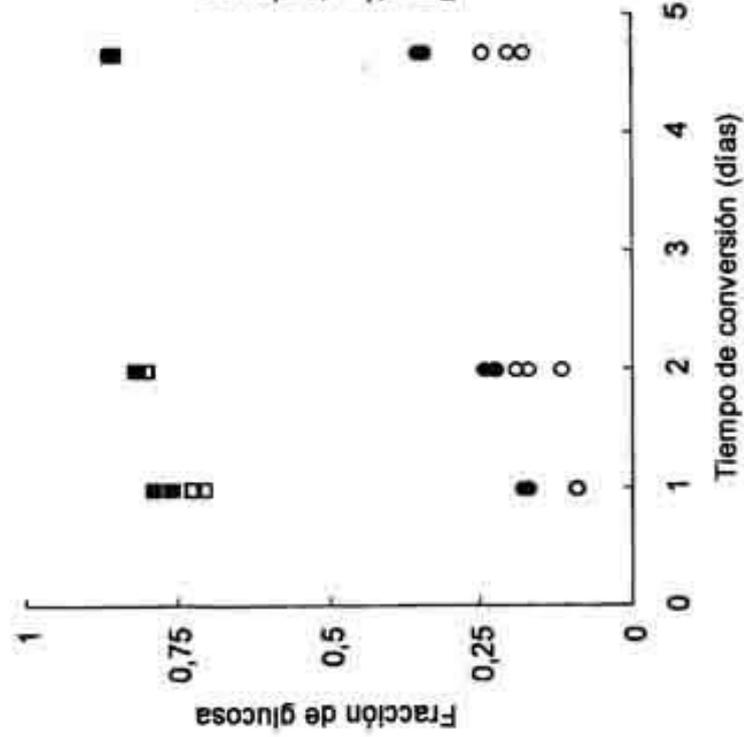


FIG. 9(A)

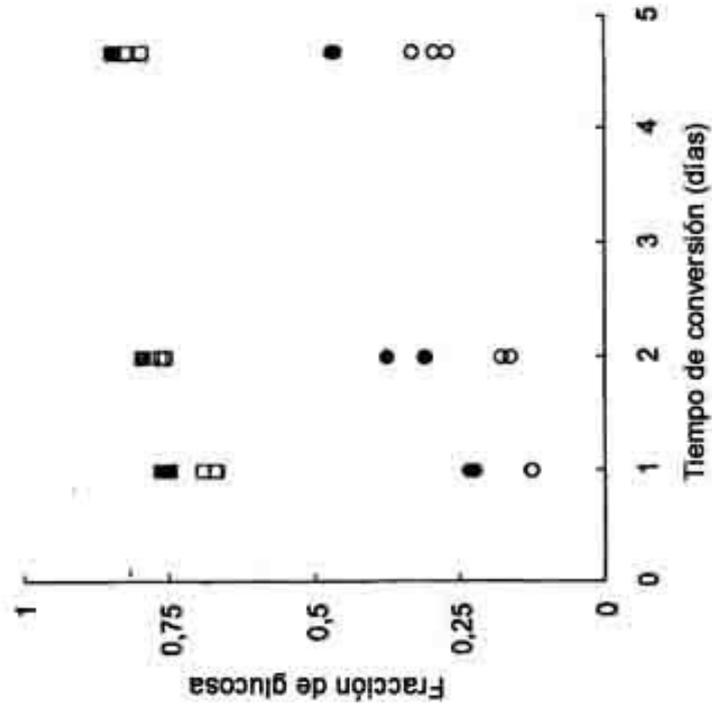
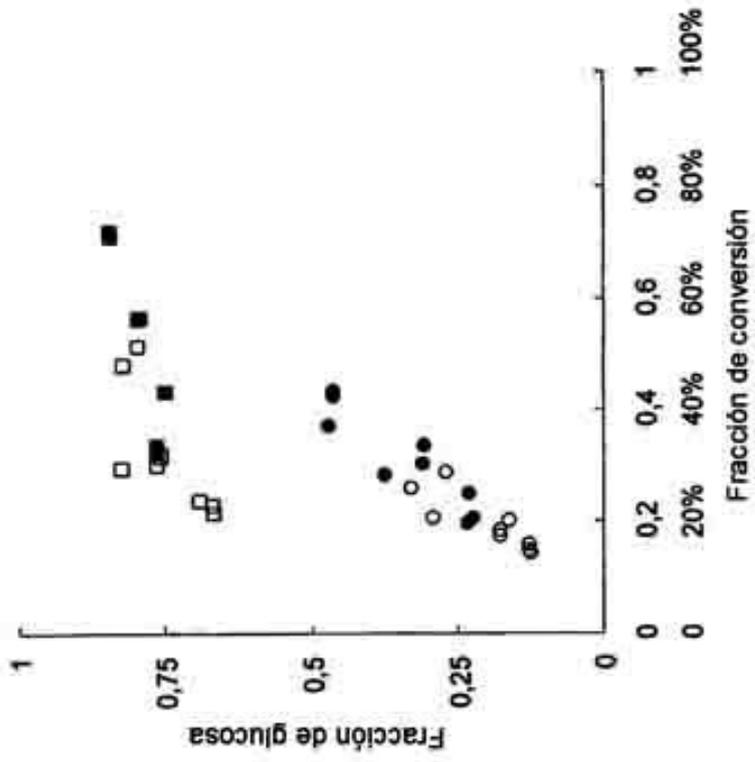
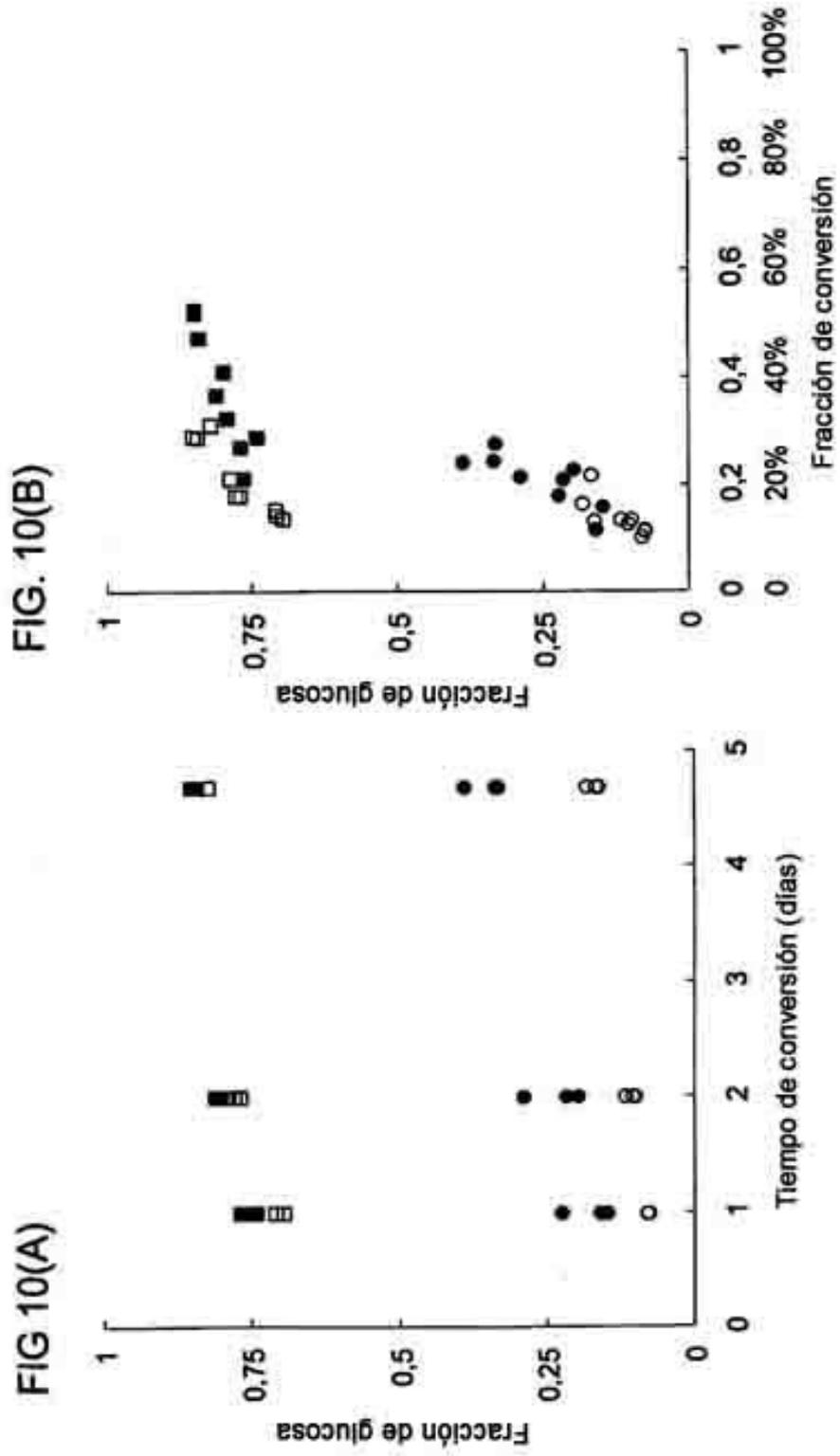


FIG. 9(B)





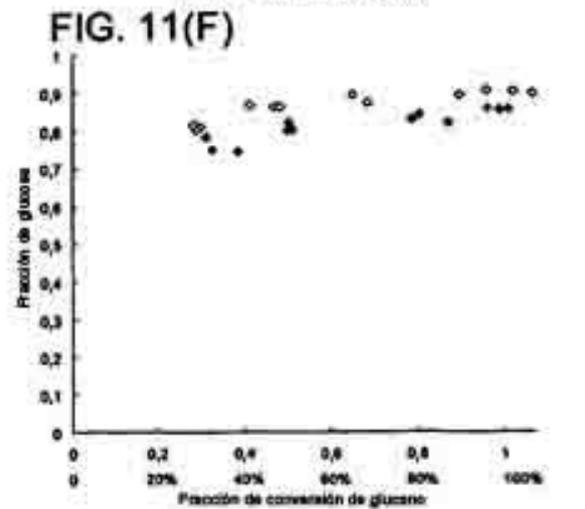
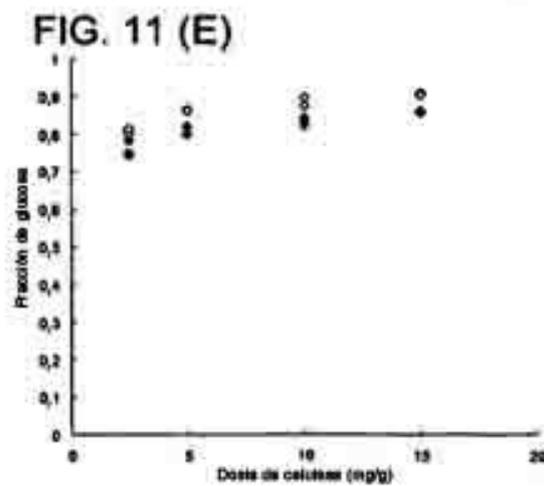
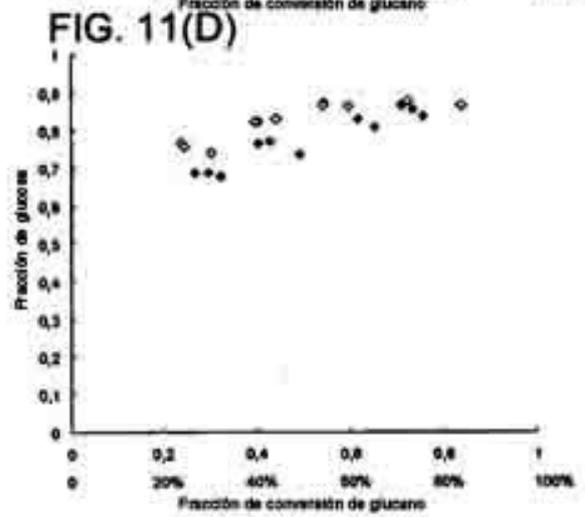
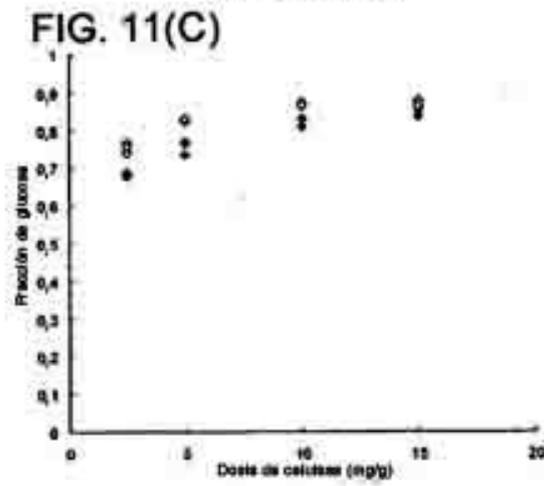
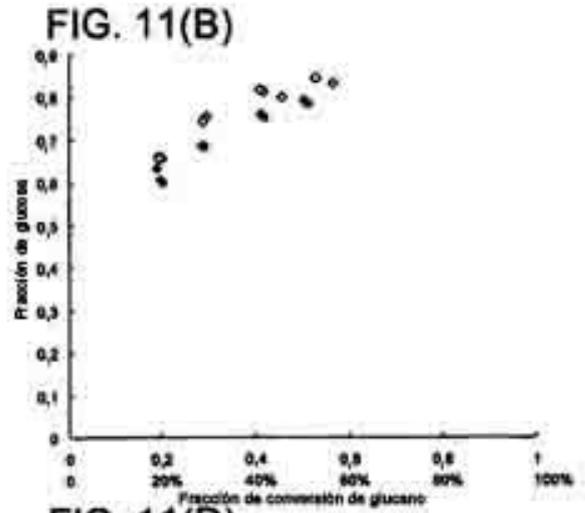
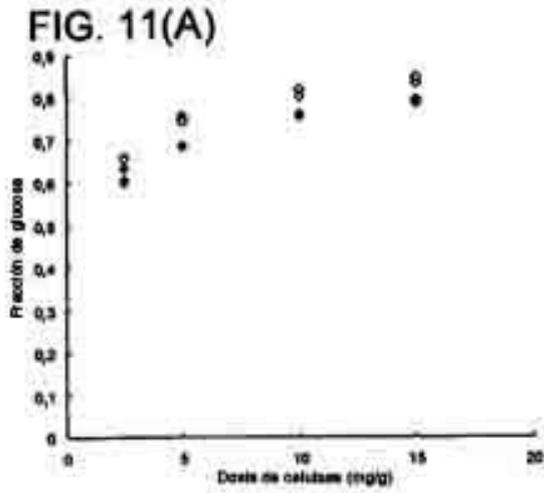


FIG. 12(A)

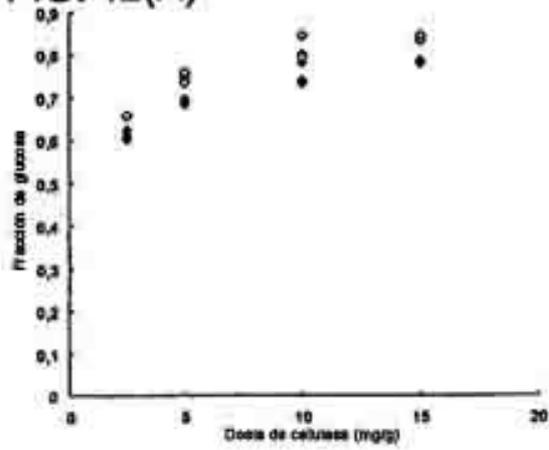


FIG. 12(B)

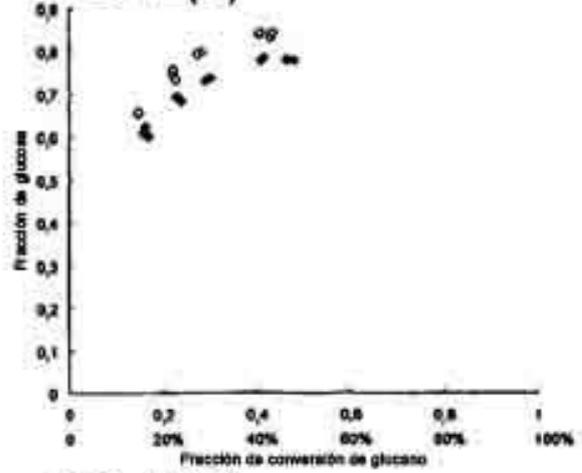


FIG. 12(C)

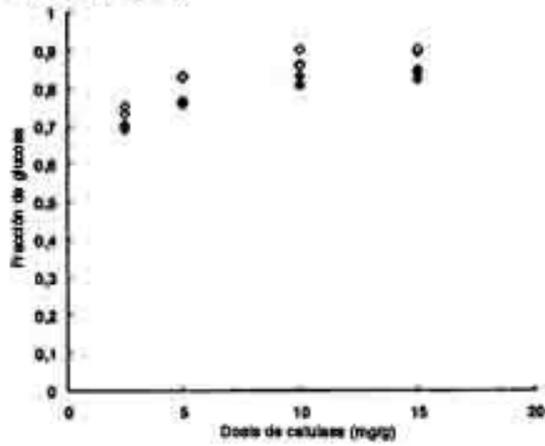


FIG. 12(D)

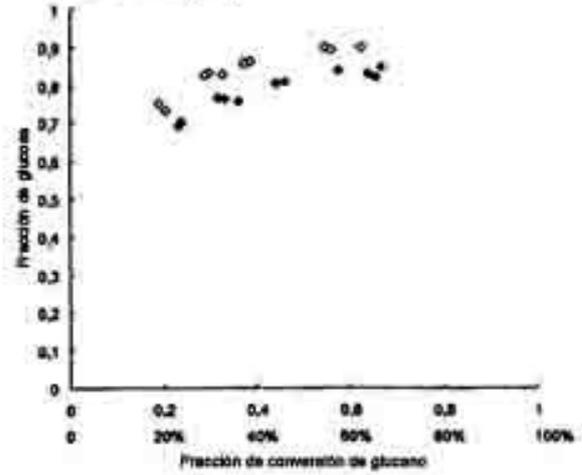


FIG. 12(E)

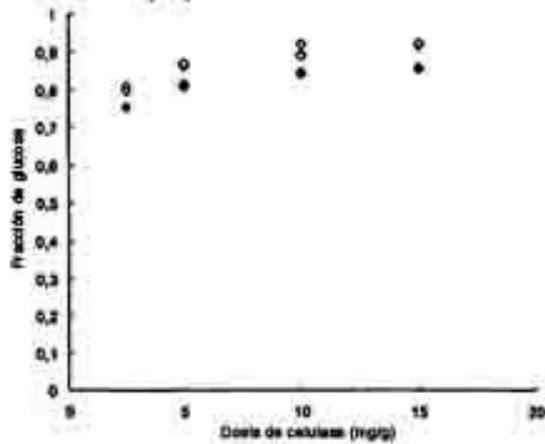


FIG. 12(F)

