

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 930**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

C12P 19/12 (2006.01)

C12P 5/02 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07705998 .8**

96 Fecha de presentación: **09.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1989300**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2008**

54 Título: **Cepa de TALAROMYCES EMERSONII y usos de la misma**

30 Prioridad:

10.02.2006 IE 20060090

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

02.01.2013

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

02.01.2013

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND GALWAY
(100.0%)
UNIVERSITY ROAD
GALWAY, IE**

72 Inventor/es:

**TUOHY, MARIA, GERARDINE;
MURRAY, PATRICK, GERARD;
GILLERAN, CAROLINE, TERESA;
COLLINS, CATHERINE, MAJELLA;
REEN, FRANCIS, JEREMIAH;
MCLOUGHLIN, LASSARINA, PATRICK;
LYDON, ANNE, GERALDINE, STEPHANIE;
MALONEY, ALAN, PATRICK;
HENEGHAN, MARY, NOELLE;
O'DONOGHUE, ANTHONY, JOHN y
MAHON, CATHAL, SEAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 930 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

Cepa de *Talaromyces emersonii* y usos de la misma

Introducción

La presente invención se refiere a una cepa de *Talaromyces emersonii* y a enzimas y a sistemas enzimáticos que pueden aislarse de la misma, para su uso en el medio ambiente y tratamiento de residuos, producción y procesamiento químico y bioquímico, procedimientos biotecnológicos, en kits de ensayo o de diagnóstico, prebióticos y simbióticos, productos sanitarios, alimentos y bebidas nuevos y funcionales producción de tensioactivos, aplicaciones agrícolas y hortícolas.

En la actualidad Europa se enfrenta a una crisis en cuanto al tratamiento de residuos produciéndose 2.000 millones de toneladas de residuos cada año. Muchos de estos residuos son orgánicos, derivados de materiales vegetales (biomasa), son ricos en carbohidratos (azúcares) y por lo tanto representan un recurso valioso cuando se descomponen en sus azúcares componentes. Otros tipos de residuos, tales como los residuos de frutas, se pudren y plantean un riesgo ambiental. Estos residuos generalmente se combinan con pienso porcino para extraer algún valor de ellos, sin embargo, se consideran residuos de bajo coste.

La biomasa representa una materia prima muy variada y variable, sin embargo es la materia prima energética más renovable de la tierra. Si se aprovechase, podría proporcionar una alternativa sostenible a las reservas de combustibles fósiles cada vez más agotadas. Existe un interés global en convertir la reserva energética de la biomasa en formas de energía utilizables. Aunque un importante centro de atención ha sido la producción de biocombustibles, tales como el bioetanol, para fines de transporte, también se han identificado mercados para co-productos valiosos generados durante la producción de biocombustibles (por ejemplo CO₂, restos ricos en lignina, materias primas químicas). En la actualidad, en los Estados Unidos, anualmente se producen aproximadamente 11.360 millones de litros de etanol a partir del maíz, principalmente para su uso en el sector del combustible para transportes. Esto representa solo aproximadamente el 1% del consumo total de combustible de motor, y se prevé que en el año 2010, la producción de bioetanol aumentará más de 7 veces, e incluirá otros sustratos de biomasa tales como restos leñosos. Si los restos leñosos derivan de fuentes de "residuos" rápidamente renovables generalmente consideradas "maleza" o broza, puede derivarse un valor considerable tanto en cuanto a los costes del procedimiento, como en el cumplimiento de dianas de producción y problemas ambientales locales. Las ventajas del bioetanol como una alternativa limpia y ecológica al petróleo y a otros combustibles fósiles son obvias. La adopción global del bioetanol como un combustible de motor principal compensaría muchos de los problemas de contaminación del aire que son una característica de las áreas urbanas densamente pobladas. Los coches modernos pueden adaptarse fácilmente para funcionar con mezclas de etanol/gasolina ("gasohol") y se dispone de nuevos motores que, como única fuente de combustible, pueden utilizar etanol puro.

La biomasa vegetal, incluyendo especies de coníferas, es rica en carbohidratos complejos (polisacáridos) que pueden descomponerse por medios químicos o enzimáticos en azúcares fermentables sencillos. Por ejemplo, las maderas blandas tales como las de picea Sitka y pino contienen (% en peso seco) aproximadamente 41-43% de celulosa (un polímero de unidades de glucosas unidas por β -1,4), 20-30% de hemicelulosa (una mezcla de polisacáridos que contienen manosa, galactosa, xilosa y arabinosa) y 25-30% de lignina, un polímero polifenólico no carbohidrato de alto valor calorífico. Por lo tanto, aproximadamente el 65-70% del peso seco de los restos leñosos son carbohidratos complejos que pueden usarse para proporcionar materias primas ricas en azúcares para fermentación a bioetanol.

Los hongos representan una de las formas de vida microbianas más importantes que descomponen tales materiales. *Talaromyces emersonii* es un hongo aerobio termófilo encontrado de forma natural en montones de compost y en otros ecosistemas que degradan materiales ricos en biomasa. La estabilidad térmica es una característica típica de muchos de los sistemas enzimáticos de *Talaromyces emersonii* aislados hasta ahora. Considerada una especie de "pudrición blanda", que puede dirigirse a todas las partes del material vegetal, este euascomiceto produce amplios sistemas enzimáticos modificadores de carbohidratos, incluyendo enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas y amilolíticas, así como una serie de actividades oxidasa/oxido reductasa y proteolítica. Por lo tanto *Talaromyces emersonii* puede acceder a sustratos de crecimiento complejos encontrados en su hábitat natural.

McCarthy y col. (2005) J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32: 125-134 desvelan una comparación de cepas de *Talaromyces emersonii* productoras de beta-glucanasa mutantes por UV y de tipo silvestre con potencial en aplicaciones de elaboración de cerveza. Moloney y col. (1983) Enzyme Microb. Technol. 5: 260-264 desvelan el aislamiento de mutantes CBS 814.70 de *Talaromyces emersonii* con actividad celulasas potenciada. Maheswari y col. (2000) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 461-488 desvelan que la temperatura de crecimiento óptima y máxima para *Talaromyces emersonii* es respectivamente de 40-45 y 55 °C.

Las Publicaciones PCT Nos WO 01/70998 y WO 02/24926 desvelan el aislamiento de celulasas de *Talaromyces emersonii* y en particular celulasas que tienen actividad β -glucanasa y xilanasa. La desventaja de estas enzimas es que solamente pueden dirigirse a un tipo (o a un número limitado) de un constituyente (o constituyentes) de un sustrato. Por lo tanto para metabolizar un sustrato determinado es necesario identificar los componentes de ese

sustrato, producir polipéptidos que tengan actividad enzimática adecuada para metabolizar estos componentes, producir una cantidad necesaria del polipéptido por procedimientos rutinarios, tales como, técnicas recombinantes, modificar los polipéptidos, si fuese necesario, para modificar la termoestabilidad o el pH óptimo, por ejemplo, de las enzimas, expresar el polipéptido y usar la enzima resultante para dirigir a ese constituyente de ese sustrato. Estos procedimientos son muy costosos y requieren mucho tiempo.

Además, estos procedimientos no tienen en cuenta el que algunas enzimas pueden mostrar más de una actividad o, cuando se usan en combinación con otra enzima, pueden tener eficacia modificada. Por lo tanto estos procedimientos podrían conducir a la sobreproducción de enzimas que no se requieren conduciendo también por lo tanto a costes de gasto y tiempo excesivos. Existe por lo tanto la necesidad de disponer de enzimas y sistemas enzimáticos aislados de *Talaromyces emersonii* y un procedimiento para aislar tales enzimas y sistemas enzimáticos que supere las desventajas anteriormente mencionadas.

También existe la necesidad de composiciones enzimáticas optimizadas, particularmente composiciones enzimáticas termoestables, para generar "jarabes" ricos en azúcares fermentables, para su uso en proyectos de biomasa a bioetanol. Puesto que los sustratos de biomasa o materias primas diana para la producción de bioetanol pueden variar de flujos de residuos (por ejemplo VFCW y OFMSW (Fracción Vegetal de Residuos Recogidos y Fracción Orgánica de Residuos Sólidos Municipales) a cultivos agrícolas (por ejemplo, maíz, remolacha azucarera, hierbas, etc.) a biomasa leñosa, la consecución de la preparación enzimática correcta, a un coste de procedimiento bajo, para obtener máximo rendimiento de azúcares fermentables es un reto significativo. Durante muchos años, el coste de las enzimas usadas en la conversión de biomasa antes de la producción de bioetanol por fermentación microbiana ha sido un factor negativo importante. Es por lo tanto un objeto producir preparaciones enzimáticas de bajo coste para estos fines.

Las preparaciones enzimáticas derivan de fuentes fúngicas termófilas, generalmente consideradas seguras (GRAS), mientras que las enzimas fúngicas en uso hasta ahora en aplicaciones de bioetanol comerciales y de investigación son principalmente de fuentes mesófilas (por ejemplo *Trichoderma sp.*, *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*).

También existe la necesidad de preparaciones enzimáticas que actúen a temperaturas de reacción más elevadas, es decir, las enzimas termoestables permiten tiempos de reacción/etapas de tratamiento enzimático más cortos, permiten la pasteurización simultánea del hidrolizado, dan como resultado una hidrólisis/sacarificación global significativa, tienen un potencial para reducir la carga enzimática y/o un potencial para reciclar la preparación enzimática, todo lo cual puede servir para reducir costes asociados con el uso de estas enzimas.

Declaración de la invención

La presente invención se refiere a una cepa de *Talaromyces emersonii* que se depositó en el Instituto Micológico Internacional (CABI Bioscience Reino Unido) el 2 de noviembre de 2005 con el número IMI 393751.

La ventaja de usar *Talaromyces emersonii* como la fuente enzimática es que es un microorganismo "generalmente considerado seguro" (GRAS) y tiene un largo historial de uso en los sectores alimentario, de bebidas, de piensos agrícolas y farmacéutico.

La ventaja de esta nueva cepa de *Talaromyces emersonii* es que las enzimas derivadas de la misma tienen una actividad óptima a temperaturas entre 54 °C y 85 °C, manteniendo algunas enzimas actividad a temperaturas de hasta 95 °C. Estas enzimas conservarán por lo tanto la actividad incluso cuando se deseen o se requieran temperaturas de procesamiento altas, por ejemplo, producción de materias primas ricas en azúcares para producción bioquímica, biofarmacéutica, química o de biocombustibles (etanol y metano), en la que las temperaturas de reacción de 65-90 °C facilitan velocidades de reacción simultáneas más altas, conversión de sustrato más rápida y pasteurización simultánea de materias primas, lo que mejora el potencial de almacenamiento y transporte. Adicionalmente, ya que con estas enzimas pueden usarse temperaturas más altas, cada procedimiento tiene un tiempo de reacción más corto de modo que hay un ahorro tanto de tiempo como de costes. Una ventaja adicional es que si la temperatura es suficientemente alta, se producirá pasteurización destruyendo cualquier microorganismo no deseable que no pueda soportar tales temperaturas altas. Adicionalmente se ha mostrado que las enzimas purificadas a partir de esta cepa tienen una vida útil más larga.

La cepa de la invención puede proporcionar un sistema enzimático que comprende una celobiohidrolasa I o una celobiohidrolasa II o una mezcla de las mismas, una β -glucosidasa 1, una xilanasa y una endo- β -(1,3)4-glucanasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar este microorganismo para la bioconversión de plantas o materiales derivados de plantas, tales como materiales de plantas vírgenes de origen terrestre y marino, y flujos de residuos de los mismos, incluyendo restos de café, té, fermentación de cerveza y bebidas, fruta y pieles/peladuras de fruta, peladuras de verduras, procesamiento de alimentos y hostelería, residuos de hojas/hortícolas, residuos florales, cereales y restos de procesamiento de cereales, otros residuos agrícolas y de jardinería, residuos de producción y tiendas de panadería, productos de papel tales como revistas en color satinadas y periódicos en color, periódicos en blanco y negro, papel blanco, en color y reciclado, papel marrón, bolsas de papel, cartulina y cartón, tazas y platos de papel, pañuelos de papel, toallitas, celofán y Sellotape® (cinta adhesiva), envases biodegradables,

residuos hospitalarios ricos en celulosa, tales como, vendas, papeles, toallitas, vendajes, máscaras, textiles tales como pijamas y toallas y para uso posterior en la producción de biocombustible (bioetanol y biogas).

La cepa de la invención puede producir un sistema enzimático que comprende una celobiohidrolasa I o una celobiohidrolasa II o una mezcla de las mismas, una β -glucosidasa 1, una xilanasa y una endo- β -(1,3)4-glucanasa.

5 La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en la producción de materias primas ricas en monosacáridos a partir de restos vegetales para la generación de productos de alto valor, por ejemplo antibióticos, antibióticos y antivirales, carotenoides, antioxidantes, disolventes y otros compuestos químicos y bioquímicos, incluyendo ingredientes de uso alimentario, aditivos para cosméticos, oligosacáridos y glicopéptidos para investigación y glicómica funcional.

10 La invención proporciona una cepa termófila de *Talaromyces emersonii*, que tiene un intervalo de temperatura de crecimiento de 30 a 90 °C, con un intervalo óptimo de 30 a 55 °C y que produce de forma activa enzimas a temperaturas por encima de 55 °C. La cepa de *Talaromyces emersonii* se depositó con el número de depósito IMI 393751. La invención se refiere a un mutante de la misma que también codifica enzimas termoestables, una enzima producida por la cepa que conserva actividad a temperaturas por encima de 55 °C. La enzima puede seleccionarse del grupo que consiste en enzimas modificadoras de carbohidratos, enzimas proteolíticas, oxidasas y óxidorreductasas.

La cepa de la invención puede producir una composición enzimática que comprende una celobiohidrolasa I o una celobiohidrolasa II o una mezcla de las mismas, una β -glucosidasa 1, una xilanasa y una endo- β -(1,3)4-glucanasa. La composición enzimática puede comprender del 0,5 al 90% de celobiohidrolasa I o de una celobiohidrolasa II o una mezcla de las mismas, del 0,1 al 33% de β -glucosidasa 1, del 0,6 al 89% de xilanasa y del 0,4 al 68% de endo- β -(1,3)4-glucanasa.

La cepa de la invención también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (10-30%), CBHII (10-15%), β -(1,3)4-glucanasa (20-45%), β -glucosidasa (2-15%) y xilanasa (18-55%). La composición puede comprender además una o más de las siguientes: β -xilosidasa, α -glucuronidasa, exoxilanasa, α -L-arabinofuranosidasa, enzimas pectinolíticas, hemicelulasas, enzimas modificadoras de almidón, oxidoreductasa oxidasa y esterasas; y proteasas.

La invención también proporciona un procedimiento para usar este microorganismo en el procesamiento y reciclado de madera de construcción, madera y productos derivados de la madera. Es eficaz contra materiales leñosos altamente lignificados, y es resistente a posibles moléculas inhibitorias presentes en restos leñosos y materiales procesados (por ejemplo extractivos, resinas, productos de descomposición de lignina, derivado de hidroxifurfural y furfural).

La cepa de la invención también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (15-30%), CBH II (10-40%), β -(1,3)4-glucanasa (15-40%), β -glucosidasa (2-15%), xilanasa (15-30%) y 1-8% de β -xilosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: exoxilanasa; α -glucuronidasa; α -L-arabinofuranosidasa; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasas; actividad modificadora de almidón; otras hemicelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa oxidasa y esterasas. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en procesamiento y reciclado textil. La cepa de la invención también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (5-55%), CBH II (8-50%), β -(1,3)4-glucanasa (10-30%), β -glucosidasa (0,5-30%), xilanasa (5-30%) y β -xilosidasa (0,1-10%). La composición puede comprender además una o más de las siguientes: α -L-arabinofuranosidasa; α -glucuronidasa; otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas seleccionadas, esterasas; proteasa; y oxidasas. La invención también proporciona un procedimiento para usar este sistema de cepa en la sacarificación de residuos de papel.

La cepa de la invención también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (2-10%), CBH II (2-10%), β -(1,3)4-glucanasa (10-45%), β -glucosidasa (5-10%) y Xilanasa (1-30%). La composición puede comprender adicionalmente una o más de las siguientes: N-acetilglucosaminidasa; quitinasa; β -(1,3)6-glucanasa; β -xilosidasa, α -glucuronidasa; α -L-arabinofuranosidasa; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasas; actividad modificadora de almidón; otras hemicelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; y proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en estrategias antifúngicas, de biocontrol y de control de lodo en los sectores medioambiental, médico y de la construcción (por ejemplo combate de la podredumbre seca), y en la industria de la pulpa y el papel (por ejemplo control de lodo).

La cepa de la invención también puede producir un sistema enzimático que comprende CBHI (1-20%), CBH II (1-28%), β -(1,3)4-glucanasa (15-40%), β -glucosidasa (2-15%), xilanasa (18-55%), β -xilosidasa (0,1-10%) y α -L-arabinofuranosidasa (0,5-5,0%). La composición puede comprender además una o más de las siguientes; α -glucuronidasa; actividad modificadora de almidón; otras hemicelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; proteasa; exoxilanasa; otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico y acetil(xilan)esterasas; proteasa; y actividades oxidasa modificadoras de lignina. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en aplicaciones hortícolas, por ejemplo, para la producción de nuevos

compuestos bioactivos para la promoción del crecimiento y la resistencia a enfermedades. Por ejemplo esta cepa puede usarse para la liberación de glicósidos flavonoides bioactivos, para la producción de oligogalacturónidos de materiales ricos en pectina, xiloglucoligosacáridos de xiloglucanos, galactooligosacáridos de galactanos, xilooligosacáridos sustituidos de xitanos vegetales o 1,3-glucoligosacáridos (laminariloligosacáridos) de β -glucano de la pared celular fúngica, o laminarano de algas, para promover el crecimiento en plantas, activación de mecanismos de respuesta de defensa de plantas frente a patógenos vegetales y aumentar la resistencia a enfermedades, puesto que algunos de estos oligosacáridos (por ejemplo, los laminariloligosacáridos) pueden iniciar y mediar en las propiedades bioactivas que son antifúngicas, antibacterianas y antinematodos.

La cepa de la invención también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (5-30%), CBHII (1-15%), β (1,3)4-glucanasa (10-40%), β -glucosidasa (2-15%), xilanasa (18-48%), 0,1-20% de β -xilosidasa, 1-10%, α -glucuronidasa y 0,1-5,0 % de α -L-arabinofuranosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: exoxilanasa; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa; actividad modificadora de almidón; otras hemicelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa oxidasa y esterasas y proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en la producción de piensos para animales para potenciar la digestibilidad de los piensos basados en cereales. Esta cepa degrada los componentes fibrosos de los piensos basados en cereales a oligosacáridos y monosacáridos (azúcares sencillos), alguno de los cuales se absorben en el intestino y se metabolizan. La cepa también produce oligosacáridos 'prebióticos' (por ejemplo, glucoligosacáridos de enlace mixto de β -glucanos de cereales no celulósicos) que refuerzan el crecimiento de bacterias prebióticas, y pueden liberar antioxidantes, por ejemplo, ácido ferúlico, y producir oligosacáridos (glucurono-xilooligosacáridos sustituidos de xitanos del cereal) que tienen un efecto antibacteriano en especies de la microflora intestinal que se sabe que producen moléculas carcinogénicas (por ejemplo fenoles, aminas, etc.).

La cepa de la invención también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (0,5-10%), CBH II (0,5-10%), β (1,3) 4-glucanasa (15-43%), β -glucosidasa (2-10%), xilanasa (30-88%), 0,1-2,0% de β -xilosidasa, 0,1-3,0% de α -glucuronidasa, 0,1-4,0% de α -L-arabinofuranosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: enzimas pectinolíticas; actividad modificadora del almidón; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; y proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en la producción de piensos basados en cereal que contienen bajo contenido en pentosa para animales monogástricos con digestibilidad mejorada y bajo contenido en β -glucano no celulósico. Los β -glucanos no celulósicos y los arabinoxitanos de los cereales tienen una alta capacidad para unirse al agua y generar soluciones altamente viscosas. Los animales monogástricos (por ejemplo cerdos y aves de corral) no pueden degradar estos carbohidratos, que alteran la captación y biodisponibilidad de nutrientes importantes, aumentan la difusión de enzimas digestivas, alteran la mezcla adecuada de contenidos intestinales y actúan como una barrera física para la degradación de las proteínas y almidón presentes en estos piensos. En general, estos polisacáridos pueden conducir a características malas de rendimiento de crecimiento. La cepa en la presente invención puede catalizar la degradación de arabinoxitanos de cereales y β -glucanos no celulósicos para producir oligosacáridos (principalmente DP3-10), algunos de los cuales tienen posibles propiedades probióticas, sin la liberación de azúcares de pentosa (arabinosa y xilosa), que los animales monogástricos metabolizan mal y que pueden tener efectos antinutricionales. Se proporciona un procedimiento para usar cereales alternativos como piensos, por ejemplo, sorgo y maíz.

La cepa de la invención puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (3-15%), CBH-II (3-15%), (1,3) 4-glucanasa (25-45%), α -glucosidasa (2-15%), xilanasa (18-55%), 0,5-7,0% β -xilosidasa, 0,5-10% de α -glucuronidasa y 0,1-5,0% de α -L-arabinofuranosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: exoxilanasa; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa; actividad modificadora de almidón; otras amilcelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; y proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en la producción de piensos funcionales con potencial bioactivo para su uso en el cuidado de la salud humana y veterinaria. Esta cepa puede producir oligosacáridos bioactivos a partir de materias primas con estado GRAS para su uso en el cuidado de la salud animal (animales de compañía y de mayor tamaño), incluyendo β -glucoligosacáridos inmunoestimuladores de plantas y hongos terrestres y marinos, xilooligosacáridos con propiedades prebióticas y antimicrobianas de plantas terrestres y marinas, quitooligosacáridos con promoción del crecimiento, potencial antimicrobiano y antiviral de paredes celulares fúngicas y de crustáceos, y compuestos fenólicos con potencial antioxidante.

La cepa de la invención puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (1-15%), CBHII (1-15%), β (1,3) 4-glucanasa (10-45%), α -glucosidasa (2-10%), xilanasa (1-55%), 0,5-12% de β -xilosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa, α -L- arabinofuranosidasa; β (1,3) 6-glucanasa; N-acetilglucosaminidasa; quirinasas, enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa; actividad modificadora de almidón; otras hemicelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en la producción de productos lácteos o dietéticos especializados, por ejemplo, productos alimenticios y formulaciones de bebidas para cuidados sanitarios geriátricos e infantiles. Por ejemplo, esta cepa puede usarse para la producción de productos alimenticios fácilmente digeribles, ricos en prebióticos, para la nutrición geriátrica e infantil, y también para la producción de productos sin lactosa para

individuos con galactosemia o para los que son intolerantes a la lactosa.

La cepa de la invención puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (1-10%), CBH II (5-15%), β (1,3) 4-glucanasa (15-40%), α -glucosidasa (2-30%), xilanasa (15-55%), 1-12% de β -xilosidasa, 1-8% de α -glucuronidasa y 0,5-5,0% de α -L-arabinofuronosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa; actividad modificadora de almidón; otras hemicelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa en los sectores de la panadería y confitería, y en la formulación de nuevos productos de panadería de comida sana. La cepa es adecuada para la utilización de nuevas materias primas/cereales, tales como, centeno, maíz y sorgo. La cepa puede aumentar el volumen de la barra de pan y potenciar la caducidad modificando selectivamente los componentes de arabinoxilano de las harinas de cereales, generar oligosacáridos prebióticos e inmunoestimuladores y efectuar la liberación de moléculas antioxidantes (por ejemplo ácidos ferúlico y cumárico), y modificar la textura, aroma y propiedades sensoriales de los productos de panadería y confitería.

La cepa también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (1-20%), CBH II (140%), (1-40%), β (1,3) 4-glucanasa (15-45%), α -glucosidasa (2-30%), xilanasa (10-55%), 0,5-10% de β -xilosidasa, 0,1-5% de α -L-arabinofuronosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: β (1,3) 6-glucanasa; N-acetilglucosaminidasa; quitinasa α -glucuronidasa; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa; actividad modificadora de almidón; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; proteasa. Se proporciona un procedimiento para usar esta cepa en la generación de compuestos precursores de sabor, aroma y sensoriales en la industria alimenticia liberando monosacáridos y disacáridos que pueden fermentarse en una diversidad de productos incluyendo ácido cítrico, vainillina, etc., liberando glicoconjugados aromáticos (precursores del aroma) de frutas/pulpas de fruta (por ejemplo, alcoholes aromáticos glicosilados encontrados en diversas frutas, incluyendo melón, así como, geraniol, limoneno, etc.), péptidos con sabores salado, amargo y dulce, aminoácidos para la transformación en edulcorantes (por ejemplo, fenilalanina) y moléculas fenólicas (ácidos cinámicos, glicósidos flavonoides tales como quercetín-3-O-ramnósido), que tienen propiedades de sabor, aroma o sensoriales o son precursores de tales productos, por ejemplo, ramnosa, que pueden bioconvertirse a furaneol, una molécula con sabor a fresa. Además, algunas de estas moléculas, tales como los glicósidos flavonoides tienen actividad antioxidante y antimicrobiana (anti-protosoaria).

La cepa también puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (1-15%), CBH II (1-15%), β (1,3) 4-glucanasa (10-45%), β -glucosidasa (2-30%), xilanasa (1-55%), 0,5-12% de β -xilosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: α -L-arabinofuronosidasa; β (1,3) 6-glucanasa; N-acetilglucosaminidasa; quitinasa α -glucuronidasa; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa; actividad modificadora de almidón; otras hemicelulasas, incluyendo galactosidasas; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; y proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa para la generación de alimentos funcionales, específicamente, la modificación de carbohidratos vegetales (terrestres y algunos marinos) para generar productos alimenticios con propiedades promotoras de la salud potenciadas, por ejemplo, productos alimenticios enriquecidos en glucooligosacáridos inmunoestimuladores, xilooligosacáridos, oligosacáridos de soja, (arabino) gatactooligosacáridos (galacto) y/o (gluco) manooligosacáridos, gentiooligosacáridos, isomaltooligosacáridos y oligosacáridos de galatinosa, y promover la liberación de moléculas antioxidantes tales como carotenoides y sustancias fenólicas (ácidos cinámicos, catequinas y glicósidos flavonoides).

La cepa puede producir un sistema enzimático que comprende CBH I (1-15%), CBH II (1-15%), β (1,3)4-glucanasa (10-45%), β -glucosidasa (1-15%), xilanasa (1-30%), 0,5-20% de β -xilosidasa. La composición puede comprender además una o más de las siguientes: α -L-arabinofuronosidasa; β (1,3)6-glucanasa; N-acetilglucosaminidasa; quitinasa; α -glucuronidasa; enzimas pectinolíticas, incluyendo galactosidasas, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa; actividad modificadora de almidón; oxidoreductasa oxidasa y esterasas; proteasa. La invención también proporciona un procedimiento para usar esta cepa para la producción de nuevas bebidas alcohólicas y no alcohólicas de diseño, zumos de frutas y bebidas sanas. Este sistema puede modificar β -(1,3) 4-glucanos, sustancias pécticas, arabinanos, xilanos, lactosa, proteínas y sustancias fenólicas para generar cervezas/cervezas rubias alcohólicas y no alcohólicas bajas en calorías, zumos de frutas y bebidas sanas con potencial sensorial, antioxidante, inmunoreforzador, antibacteriano y antiviral mejorado, por ejemplo, una cerveza "ligera" con bajo contenido en β -glucano residual para evitar la formación de turbidez (pero suficiente β -glucano para proporcionar características organolépticas) que contiene glucooligosacáridos de enlace mixto bioactivos y ácidos cinámicos (antioxidantes), o un zumo de frutas rico en fragmentos de pectina (oligosacáridos), que tienen un efecto prebiótico, y ácidos cinámicos y glicósidos flavonoides que proporcionan potencial antioxidante.

La cepa puede producir una composición enzimática CBH I (1-25%), CBH II (1-28%), β (1,3)4-glucanasa (18-40%), β -glucosidasa (2-30%), xilanasa (15-55%) y β -xilosidasa (0,7-20%). La composición puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa (1-10%), α -L-arabinofuronosidasa (0,1-5,0%), 1-15% de exoxilanasa, 5-25% de enzimas pectinolíticas, 2-12% de actividad modificadora de almidón, 2-11% de hemicelulasas, 1-15% de oxidoreductasa/oxidasa y esterasas y 2-15% de proteasa. La composición puede usarse en la producción de

materias primas ricas en monosacáridos a partir de restos vegetales.

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (12-55%), CBH II (15-30%), β (1,3)4-glucanasa (12-26%), β -glucosidasa (5-12%), xilanasa (5-30%), β -xilosidasa (0,1-10%) y α -L- arabinofuronosidasa (0,5-3,0%). La composición puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa, otras hidrolasas incluyendo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico y acetil (xilan) esterasas, proteasa y actividades oxidasa modificadoras de lignina, proteasas y oxidasas. La composición puede usarse en el procesamiento y reciclado de madera, productos de papel y papel.

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (3-15%), CBH II (3-15%), β (1,3) 4-glucanasa (15-45%), β -glucosidasa (1-15%), xilanasa (16-55%) y β -xilosidasa (0,5-7%). La composición puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa, α -L- arabinofuronosidasa, exoxilanasa, enzimas pectinolíticas, enzimas con actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas y proteasas. La composición puede usarse en la producción de compuestos biofarmacéuticos, tales como oligosacáridos bioactivos (incluyendo 1,3(4) y 1,3(6)-glucooligosacáridos de enlace mixto, galactooligosacáridos, xiloglucoligosacáridos, oligosacáridos pépticos, xilooligosacáridos ramificados y lineales, (galacto) glucomano-oligosacáridos, glicopéptidos y glicósidos flavonoides de plantas terrestres y marinas, restos vegetales, hongos y flujos de aguas residuales o productos secundarios ricos en azúcares sencillos.

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (1-20%), CBH II (1-40%), β (1,2)4-glucanasa (15-45%), β -glucosidasa (2-12%), xilanasa (1-35%) y β -xilosidasa (1-5%). La composición enzimática puede comprender además una o más de las siguientes; α -glucuronidasa, α -L- arabinofuronosidasa, exoxilanasa, enzimas pectinolíticas, actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas y proteasas. La composición puede usarse para aumentar la biodisponibilidad de biomoléculas con actividad antibacteriana y antiviral natural, incluyendo glicósidos flavonoides y cianogénicos, saponinas, oligosacáridos y fenólicos (incluyendo ácidos ferúlico y p-cumárico, epicatequina, catequina, ácido pirogálico y similares).

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (3-15%), CBH II (3-15%), β (1,3) 4-glucanasa (25-45%), β -glucosidasa (2-15%), xilanasa (10-30%) y β -xilosidasa (0,5-8%). La composición enzimática puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa, α -L- arabinofuronosidasa, exoxilanasa, enzimas pectinolíticas, actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas y proteasa. La composición puede usarse para aumentar la biodisponibilidad de biomoléculas antioxidantes naturales, por ejemplo, carotenoides, licopenos, xantofilas, antocianinas, fenólicos y glicósidos de todos los materiales, restos, residuos vegetales, incluyendo diversos frutos y bayas.

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (1-25%), CBH II (1-40%), β (1,3) 4-glucanasa (15-40%), β -glucosidasa (2-15%), xilanasa (18-35%) y β -xilosidasa (0,5-12%). La composición enzimática puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa, α -L- arabinofuronosidasa, enzimas pectinolíticas, actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas y proteasa. La composición puede usarse para la generación de piensos a partir de materias primas vegetales, restos vegetales y residuos para su uso en la producción microbiana de antibióticos por hongos y bacterias, incluyendo *Penicillium sp.* y *Streptomyces sp.*

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (1-30%), CBH II (1-40%), β (1,3)4-glucanasa (15-40%), β -glucosidasa (2-15%), xilanasa (18-35%) y β -xilosidasa (0,5-8%). La composición enzimática puede comprender además una o más de las siguientes; α -glucuronidasa, α -L-arabinofuronosidasa, enzimas pectinolíticas, actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas; exoxilanasa y proteasas. La composición puede usarse en la generación de piensos a partir de materias primas vegetales, restos vegetales y residuos para su uso en la producción microbiana del ácido cítrico.

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (2-15%), CBH II (2-15%), β (1,3)4-glucanasa (20-45%), β -glucosidasa (2-25%), xilanasa (1-30%) y β -xilosidasa (0,5-8%). La composición enzimática puede comprender además una o más de las siguientes; α -glucuronidasa, α -L-arabinofuronosidasa, enzimas pectinolíticas, actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas, exoxilanasa y proteasas. La composición puede usarse en la producción de oligosacáridos a partir de polisacáridos de algas (por ejemplo, laminarano y fucoidano) y aditivos derivados de extractos vegetales, por procedimientos generalmente considerados seguros, en la formulación de cosméticos.

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (3-30%), CBH II (1-10%), β (1,3)4-glucanasa (10-45%), β -glucosidasa (2-12%), xilanasa (1-48%) y β -xilosidasa (0,1-8%). La composición enzimática puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa, α -L- arabinofuronosidasa, enzimas pectinolíticas, actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas, exoxilanasa y proteasas. La composición puede usarse en la producción de oligosacáridos y glicopéptidos para su uso como reactivos de investigación, en la producción de biodetectores y como herramientas en glicómica funcional para explorar interacciones de tipo receptor-ligando y en la producción de bibliotecas de sustratos para realizar los perfiles de especificidad de enzima-sustrato.

La cepa puede producir una composición enzimática que comprende CBH I (5-15%), CBH II (5-30%), $\beta(1,3)$ -glucanasa (20-45%), β -glucosidasa (1-12%), xilanasa (10-30%) y β -xilosidasa (0,5-8%). La composición enzimática puede comprender además una o más de las siguientes: α -glucuronidasa, α -L-arabinofuranosidasa, enzimas pectinolíticas, enzimas con actividad modificadora de almidón, hemicelulasas, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas y proteasas. La composición puede usarse para la producción de celulosa modificada y β -glucanos, celooligosacáridos, almidones modificados y maltooligosacáridos, lactulosa y polioles (por ejemplo, manitol, glucitol o dulcitol, xilitol, arabitol).

Como materia prima puede usarse un sustrato producido por cualquiera de los procedimientos anteriores en la producción de biocombustible y bioetanol o biogas tal como metano o dióxido de carbono, siempre que se produzca por ese procedimiento. La ventaja de usar esta cepa para producir bioetanol o biogás, es que este es un procedimiento rentable para producir, a partir de un producto residual poco valioso, un producto valioso que puede usarse en muchas industrias. Al mismo tiempo que produce un producto valioso, hay una reducción de los residuos lo que a su vez tiene un impacto positivo en el medio ambiente.

Todos los procedimientos descritos anteriormente podrían llevarse a cabo con las composiciones enzimáticas como se han definido en el presente documento o con las cepas microbianas descritas en el presente documento.

La invención también proporciona el uso de la cepa o mutantes de la misma que comprende además el uso de enzimas derivadas de otras especies fúngicas incluyendo *Chaetomium thermophile* y *Thermoascus aurantiacus*.

La cepa del microorganismo es *Talaromyces emersonii* IMI 393751 o un mutante de la misma que también es capaz de producir enzimas capaces de tener actividad a temperaturas de, o por encima de, 55 °C.

Se describe además un procedimiento para obtener un sistema enzimático adecuado para convertir un sustrato diana comprendiendo el procedimiento: obtener una muestra del sustrato diana; permitir que crezca un inóculo de una cepa de microorganismo en el sustrato diana y secrete enzimas; recuperar las enzimas secretadas durante el crecimiento en el sustrato diana; determinar las actividades y propiedades enzimáticas; construir un perfil de expresión génica; identificar las proteínas enzimáticas y construir un perfil de expresión proteico; comparar la expresión génica con el perfil de expresión proteico; purificar las enzimas. Las enzimas pueden después conservarse. El procedimiento puede comprender además analizar las enzimas y/o diseñar un sistema enzimático.

Descripción detallada de la invención

La invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción, proporcionada solamente como ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1: esquema de proceso para un procedimiento de diseño de un sistema enzimático adecuado para convertir un sustrato diana.

Figura 2: Generación de una materia prima rica en azúcar para la producción de biocombustible por tratamiento termoenzimático de pulpa/orujo de manzana.

Figura 3: Cromatograma en capa fina de los productos generados durante la hidrólisis de vasos de papel.

Figura 4: Microscopía electrónica de vasos de papel antes (0 h) y después (24 h) del tratamiento con el cóctel enzimático de *Talaromyces emersonii* inducido en vasos de papel demostrando amplia hidrólisis del sustrato diana.

Figuras 5A-D: Comparación de la producción de xilanasa por la cepa 393751 y la cepa de tipo silvestre CBS 549.92 (anteriormente CBS 814.70).

Figuras 6A-E: Comparación de la producción de glucanasa y (galacto) mananasa por la cepa 393751 y la cepa de tipo silvestre CBS 549.92.

Figura 7: Reducción del volumen de residuos clínicos ricos en celulosa esterilizados, catalizado por los cócteles de 10 enzimas a 50°C después de 24 horas.

Figura 8: Reducción del volumen de residuos clínicos ricos en celulosa esterilizados por STG catalizado por los cócteles de 10 enzimas a 70°C después de 24 horas.

Figuras 9A-B: Residuos ricos en celulosa no tratados (A) y residuos tratados con enzimas (B).

Figuras 10A-B: Producción de etanol por *S. cerevisiae* en hidrolizados obtenidos por tratamiento de residuos clínicos ricos en celulosa esterilizados a 70°C durante 24 h (humedad al 60%) con cóctel 5 (A) y cóctel 8 (B).

Figura 11A: efecto del pH sobre la actividad celulasa en los cócteles de *T. emersonii*.

Figura 11B: efecto del pH sobre la actividad xilanasa en los cócteles de *T. emersonii*.

Figura 12: efecto de la temperatura sobre la actividad celulasa en los cócteles de *T. emersonii*.

Figura 13: efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa en los cócteles de *T. emersonii*.

Figura 14: Actividad de la nueva xilanasa purificada frente a diferentes xilanos. OSX, xilano de cascarillas de avena (*Oat Spelts Xylan*); WSX, xilano de paja de trigo (*Wheat Straw Xylan*); LWX, xilano de madera de alerce (*LarchWood Xylan*); BWX, xilano de madera de abedul (*BirchWood Xylan*); RM, Rodimenano (1,3; 1,4- β -D-xilano de algas rojas). La actividad se expresa como un % relativo al xilano de cascarillas de avena (100%).

Figura 15A-B: Actividad de (A) Xyn IV y (B) Xyn VI purificados frente a diferentes xilanos. La actividad se

expresa como un % relativo al xilano de cascarillas de avena (100%).

Figura 15 C-D: Actividad de (C) Xyn VII y (D) Xyn VIII purificados frente a diferentes xilanos. La actividad se expresa como un % relativo al xilano de cascarillas de avena (100%).

Figura 15E-F: Actividad de (E) Xyn IX y (F) Xyn X purificados contra diferentes xilanos. La actividad se expresa como un % relativo al xilano de cascarillas de avena (100%).

Figura 15G: Actividad de Xyn XI purificado, frente a diferentes xilanos. La actividad se expresa como un % relativo al xilano de cascarillas de avena (100%).

Figura 16: % de actividad relativa de Xyn XII purificado frente a una diversidad de polisacáridos purificados. OSX, xilano de cascarillas de avena (*Oat Spelts Xylan*); BBG, β -glucano de cebada (*Barley β -glucan*); LIC, liquenano (*Lichenan*); CMC, carboximetilcelulosa; LAM, laminarina; D1, dextrano; D2, dextrina; INU, inulina; ARA, arabinano; GAL L, Galactano (Lupino); GAL P, Galactano (Patata); RG, Ramnogalacturonano; LWAG, arabino-galactano de madera de alerce (*LarchWood Arabino-Galactano*)

Figura 17: Actividad específica de Xyn XII purificado frente a aril β -xilósidos y aril β -glucósidos.

Figura 18: Comparación de las actividades específicas de xilanasas seleccionadas expresadas por IMI393751 y CBS549.92 frente a OSX, xilano de cascarillas de avena, como sustrato de ensayo.

En referencia a la Figura 1, se proporciona un esquema de proceso para diseñar un sistema enzimático para convertir un sustrato diana. En la etapa 1 se obtiene un sustrato diana. En la etapa 2, el sustrato diana se inocula con el microorganismo que se cultiva en el sustrato diana para proporcionar un cultivo. El microorganismo secreta enzimas y estas enzimas se recuperan en la etapa 3, obteniendo muestras del cultivo. Las muestras de cultivo se separan en fracción celular y filtrado de cultivo en la etapa 4. La fracción celular (ARNm) se analiza en la etapa 5, para determinar las actividades y propiedades enzimáticas. En la etapa 6, se construye un perfil de expresión génica basándose en el análisis de la etapa 5. En la etapa 7, el filtrado de cultivo se explora con respecto a la actividad proteica y se construye un perfil de expresión proteico en la etapa 8. En la etapa 9 se comparan los perfiles de expresión proteica y génica. En la etapa 10 las enzimas se purifican. Las enzimas pueden conservarse en la etapa 11 y en la etapa 12 las enzimas pueden analizarse adicionalmente y en la etapa 13 se diseña un sistema enzimático.

Se ha descubierto que cuando se usa un hongo como microorganismo, se obtienen mejores resultados cuando el sustrato se inocula con el micelio del hongo. Este cultivo se lleva a cabo preferentemente en un fermentador y las condiciones de reacción variarán dependiendo del tipo de microorganismo y del sustrato usado. El cultivo puede estar en forma de fermentación en estado líquido o sólido. Para *Talaromyces emersonii* es preferible una temperatura de cultivo en la región de 45° a 65°, estando activas de forma óptima las enzimas hasta 85-90 °C.

Las enzimas se recuperan del sustrato diana por separación de la biomasa celular (fúngica) del filtrado de cultivo extracelular usando centrifugación en el caso de enzimas producidas por fermentación líquida, o con la ayuda de un sistema de separación de células para cultivos mayores. Las enzimas se recuperan después de la fracción de biomasa celular por homogeneización de un peso conocido de la biomasa en dos volúmenes de tampón. Los tampones adecuados incluyen acetato de amonio 50 mM, pH 4,5-6,0 o fosfato sódico 50 mM, pH 7,0-8,0. Para la extracción de enzimas para cultivos en estado sólido, los cultivos se mezclaron con 10 volúmenes de tampón de fosfato de citrato 100 mM, pH 5,0 que contenía Tween 80 0,01% (v/v), homogeneizado y extraído agitando durante 2 horas a 140 rpm a temperatura ambiente. Se recupera después un extracto rico en enzimas por centrifugación.

Es esencial realizar una comparación del sistema enzimático a niveles tanto de genoma como de proteoma, es decir, se compraran los genes, los productos de expresión (ARNm) y las proteínas identificados. Esto se debe a que puede haber información genética presente que se exprese a nivel de ARNm, pero que no se traduzca a proteína funcional a nivel proteico. Para determinar la abundancia relativa de determinadas enzimas son importantes los análisis transcriptómicos, genómicos y proteómicos.

Un aislado de la cepa de hongo filamentoso, del que se han aislado algunas de las enzimas, se ha depositado en el Instituto Micológico Internacional (IMI) (CABI Bioscience Reino Unido), Bakeham Lane, Englefield Green, Egham, Surrey TW20 9TY, Reino Unido para los fines del procedimiento de patentes el 22 de Noviembre de 2005, con el N° de depósito IMI 393751. Después de la purificación de las enzimas éstas pueden, opcionalmente, conservarse o analizarse directamente para obtener (a) información detallada sobre la actividad térmica/termoestabilidad individual en propiedades catalíticas y funcionales generales, (b) información detallada sobre su modo de acción y potencial catalítico, individualmente y en combinación, (c) información sobre interacciones sinérgicas, (d) información de secuencia parcial que ayudaría en la clonación de los genes y (e) en algunos casos, obtener suficiente proteína para facilitar la recogida de los datos estructurales tridimensionales. El análisis de estas enzimas se aprovecha después para identificar sistemas enzimáticos clave y momentos de recogida óptimos para estos sistemas. Los sistemas pueden optimizarse con respecto a niveles de actividades clave y combinaciones de enzimas clave, características y condiciones de rendimiento (a escala de laboratorio) para aplicaciones diana.

Ejemplo 1 T. emersonii IMI393751, aislamiento

Se colocaron esquejes de hierba (césped) limpia recién recogida (~ 200 g) y otra biomasa vegetal mixta en un recipiente cerrado para simular un ambiente de compostaje, y se incubaron en una cámara a temperatura constante, a 65 °C, durante aproximadamente 2 horas (pasteurización y equilibración combinadas del sustrato). El contenido de humedad/humectación se mantuvo a ~ 65-70%. El recipiente se equipó con una línea que proporcionaba un pulso

bajo de aire húmedo, filtrado, a intervalos. Después de 2 horas, se usó una suspensión de esporas (1×10^8 esporas en agua estéril al 2%) de *T. emersonii* (reservas de laboratorio de un aislado de 12 años de vida, originalmente de CBS814.70) para inocular la región central de la biomasa. La temperatura se mantuvo a 65 °C durante 2 días, y se aumentó en intervalos de 2 °C cada 24 horas a continuación hasta que se alcanzó una temperatura en el aire de 70 °C en el interior de la cámara. El cultivo se dejó crecer durante 7 días más antes de que se retirara, de forma aséptica, una muestra del "punto caliente" inoculado o región central y se transfiriera a placas de agar (medio de agar de Emerson para hongos termófilos), y se subcultivó, para asegurar la pureza del cultivo; la pureza se verificó por análisis microscópico. Se inoculó medio líquido que contenía nutrientes básicos (Tuohy y col. 1992; Moloney y col., 1983) y glucosa al 2% (p/v) con trozos de 1 cm² de tapiz de micelio a partir de cultivos en placas de agar de 36 horas de vida. Los cultivos líquidos se dejaron crecer a 55 °C durante 36 horas en matraces de Erlenmeyer de 250 ml (que contenían 100 ml de medio de crecimiento), con agitación a 220 rpm. Después de 36 horas, se extrajeron alícuotas (2,0 ml) de suspensiones de micelio, se lavaron de forma aséptica con agua estéril, se transfirieron a placas de Petri estériles (10 mm de diámetro) y se irradiaron con luz UV (ultravioleta) durante intervalos de tiempo cronometrados (10-60 segundos). Se inocularon medios de agar estéril (agar noble que contenía 0,2% p/v de represores de catabolitos individuales, tales como 2-desoxiglucosa) con muestras del micelio fúngico irradiado. Se incubaron cultivos repetidos a 45 y 58 °C. Se seleccionaron cuidadosamente colonias individuales (de aspecto esponjoso de color blanco), se transfirieron de forma aséptica a placas de agar de dextrosa Sabouraud y se purificaron adicionalmente mediante diversas transferencias. La cepa IMI 393751 representa un aislado extraído de las placas incubadas a 58 °C. El mutante se evaluó en un estudio comparativo con el organismo parental, con respecto a la estabilidad térmica potenciada y producción enzimática, lo que reveló claras diferencias entre ambas cepas en cuanto al aspecto del cultivo, capacidad para esporular (la cepa IMI 393751 es no-esporulante), termofilia y estabilidad, patrones de producción enzimática en condiciones de crecimiento idénticas, expresión diferencial y niveles de actividades enzimáticas individuales.

Diferencias fisiológica/micológicas entre CBS 814.70 e IMI393751

Aspecto del cultivo durante el crecimiento en diferentes medios de agar. Cuando la cepa CBS 814.70 se cultiva en agar de Emerson, tiene las características típicas de esta especie (Stolk y Samson, 1972), es decir, color beis/crema pálido, con tonos amarillentos pálidos cerca de la superficie del agar (alrededor de la zona de inoculación), que se convierte en un color beis/marrón rojizo más fuerte a medida que el cultivo madura, y consiste en un tapiz de micelio denso de muchos ascomas. Por el contrario, la cepa IMI393751 es mucho más blanca y el cultivo tiene un aspecto muy 'esponjoso'.

Diferencias con respecto a la esporulación. La cepa CBS 814.70 es una cepa esporulante de *T. emersonii*, que produce conidióforos, ascos y ascosporas. Los conidióforos aparecen como ramas perpendiculares en las hifas (de color amarillo claro y septados). Los ascos, o sacos que contienen esporas, tienen una forma un tanto elipsoidal, y pueden encontrarse con frecuencia en cadenas; las ascosporas son lisas y de forma elíptica (aparecen de color verde en una microfotografía electrónica). Por el contrario, el micelio de IMI393751 produce muy pocos conidióforos, ascos y ascosporas clásicos. Completamente al contrario que CBS814.70, la cepa IMI393751 solo produce un número insignificante de esporas en condiciones extremas y bastante específicas, mientras que la cepa CBS 814.70 produce esporas en varios medios diferentes.

Diferencias con respecto a Termofilia e intervalo de temperatura de crecimiento óptimo. La cepa CBS 814.70 tiene un intervalo de crecimiento estricto de 35-54°C, con poco crecimiento a temperaturas menores o mayores y un intervalo de crecimiento óptimo de 40-45°C. Por otro lado, la cepa IMI393751, muestra un intervalo de temperatura de crecimiento más amplio de 30-65 °C, con buen crecimiento a 80 °C, 85 °C y hasta 90 °C, con un óptimo entre 48-55 °C. La cepa IMI393751 crece muy bien a una temperatura >55 °C y continúa produciendo niveles altos de biomasa fúngica (micelio) y secretando activamente cantidades significativas de diversas proteínas.

Diferencias con respecto al crecimiento a valores de pH más altos - La cepa CBS 814.70 no crece bien (de hecho comienza a morir) a valores de pH por encima de 6-6,5 (datos anteriores, Tuohy y Coughlan, 1992), mientras que la cepa IMI393751 crece bien y secreta niveles sustanciales de enzimas a valores de pH de hasta 9,0.

Crecimiento en condiciones de limitación de nutrientes/empobrecidas. IMI393751 sobrevive bien en cultivos con escasos nutrientes durante hasta 55 días, mientras que CBS 814.70 experimenta autólisis a partir de 7 días en adelante y después de 15 días quedan pocas células/micelios supervivientes. Los micelios recogidos de cultivos líquidos con escasos nutrientes de 55 días de vida de IMI393751 podrían resucitarse por transferencia a medios de agar con dextrosa Sabouraud, mientras que, mediante la misma estrategia, los restos de micelios de la cepa CBS814.70 (55 días de vida) no podrían revivir.

Ejemplo 2: un sistema enzimático de *Talaromyces emersonii* para convertir materiales hemicelulósicos. La hidrólisis completa de xilano requiere la acción sinérgica de xilanasas, β -xilosidasa, α -glucuronidasa, α -L-arabinofuranosidasa y esterasas. La Tabla 1 proporciona un ejemplo de sustratos diana seleccionados (incluyendo residuos/restos) y el porcentaje de la fuente de carbono inductora usada en este ejemplo. El porcentaje de inducción se refiere a la cantidad de fuente de carbono por volumen de medio (g/100 ml)

Tabla1: Sustratos de crecimiento/fuentes de carbono inductoras para la producción enzimática por *T. emersonii*

Fuente de carbono	Abreviatura	% de fuente de carbono inductora
Xilano de madera de haya	BEX	1,0
Xilano de madera abedul	BWX	1,0
Xilano de cascarilla de avena	OSX	1,0
Xilano de madera de alerce	LWX	0,3
Arabinoxilano de trigo	WAX	1,0
Virutas de píceas	SS	2,0-6,0
Material de envasado	PK	0,5-6,0
Pajas de cereales	CS	1,0-2,0
Vasos de papel	PC	2,0-6,0
Papel de oficina blanco	WOP	2,0-6,0
Hojas de té	TL	2,0-4,0
Metil xilosa	MEX	0,2
Xilosa	Xyl	1
Ácido glucurónico	GlcA	1
Solka floc	SF	2 ^
Glucosa	Glc	2 ^

^ incluido con fines comparativos

Basándose en los resultados obtenidos, se diseñó un sistema enzimático usando enzimas purificadas de *Talaromyces emersonii* para la degradación de una hemicelulosa (xilano) o de un producto, resto o residuo, derivado de madera, rico en xilano. En la Tabla 2 se indican las cantidades relativas de las enzimas clave presentes en el sistema enzimático.

Tabla 2: Un sistema para la degradación de una hemicelulosa o de un producto de madera rico en xilano.

ENZIMA ^	% REQUERIDO
Xilanasa	10-50 %
Exoxylanasa	4,0-25,0 %
β -Xilosidasa	0,1-5,0%
α -glucuronidasa	0,2-4,0%
α -L-arabinofuranosidasa	0,1-5,0%
Actividades accesorias modificadoras de biopolímeros (por ejemplo, celulasa, β -glucanasa no celulolítica, actividades pectinolíticas, actividades mananolíticas, acetil(xilan) esterasa, oxidoreductasa, proteasa)	25-50%

Las cantidades relativas de las actividades principales, el perfil y las cantidades relativas de las actividades accesorias variarán dependiendo de la composición del sustrato diana. La Tabla 3 resume los sistemas enzimáticos de *Talaromyces emersonii* que se han diseñado para aplicaciones específicas.

Tabla 3: Sistemas enzimáticos específicos adecuados para la degradación de oligosacáridos de xilanos de madera, restos de papel de periódico y leñosos.

Sistema enzimático y composición	Aplicaciones/sustrato diana seleccionados	Dosificación enzimática**	% de hidrólisis de carbohidratos
Células de madera TE (inducido por LWX)* Xilanasas 15-30% ^ β -xilósidasas 0,2-1,0% α -glucuronidasas 0,1-3,0% α -L-arabinofuranosidasas 0,1-3,0% Celulasa 7-10% Glucanasa no celulósica, enzimas pectinolíticas, esterases) 20-35%	Oligosacáridos de xilanos de madera Bioconversión de papel de periódico Bioconversión de restos leñosos (por ejemplo, serrín, virutas, madera virgen, corteza, etc.)	xilano 15-30 nkat/g papel de periódico \$ 11,5 -46,0 nkat/g Restos leñosos 46,0-150 nkat/g	91-100% (1-3 h) 70-85% de carbohidrato presente % 34-50% (70 ° C/24 h) ^ ^ 35-55% (80 °C/24h) ^ ^
^ Los niveles de xilanasas se midieron con diferentes modelos de xilanos como sustratos * LWX, glucuronoarabinoxilano de madera de alerce ** Niveles de xilanasas: 45,2 UI/ml (753,5 nkat/ml), 40,9 UI/ml (681,8 nkat/ml) y 27,5 UI/ml (458,4 nkat/ml) con xilano de madera alerce, xilano de madera de abedul y xilano de cascarillas de avena como sustratos de ensayo, respectivamente; en el momento de la cosecha, en los que nkat = nanokatales (16,67 UI/ml) \$ Dependiendo de la calidad del papel de periódico, es decir, en color frente a blanco y negro, pulido frente a acabado tosco/reciclado, etc. % de celulosa, 40-55%, y hemicelulosa, 25-40% como los tipos principales de carbohidratos presentes ^ ^ % Conversión de sustrato de coníferas (fracciones no molidas y molidas en trozos grandes, no tratadas y previamente tratadas con ácido diluido). El % de conversión total puede aumentarse (hasta 74%) usando este sistema enzimático en una combinación con otros sistemas enzimáticos de <i>T. emersonii</i> o <i>Chaetomium thermophile</i> , o amplificación de actividades enzimáticas clave mediante la adición de enzima recombinante.			

Ejemplo 3: Sistema de *Talaromyces emersonii* para convertir cereales, pulpa de remolacha y otros materiales (incluyendo residuos) ricos en arabinoxilanos y hemicelulosas acetiladas.

- 5 La Tabla 4 proporciona cantidades relativas de diferentes actividades enzimáticas en sistemas enzimáticos diseñados de *Talaromyces emersonii*, cepa IMI 393751 y dos cepas mutantes previamente identificadas diseñadas para la conversión de cereales, pulpa de remolacha y otros materiales (incluyendo residuos) ricos en arabinoxilanos y hemicelulosas acetiladas.

Tabla 4: Actividades enzimáticas de sistemas para la conversión de materiales ricos en arabinoxilanos y hemicelulosas acetiladas

Preparación enzimática/composición	<i>T. emersonii</i> (IMI 393751; 1:1 WB/BP como inductor)	<i>T. emersonii</i> (IMI 393751; polvo de algarroba como inductor)	<i>T. emersonii</i> (TC2 mutante; WB como inductor)	<i>T. emersonii</i> (TC5 mutante; hojas de té como inductor)
	Perfil de actividad enzimática (%)	Perfil de actividad enzimática (%)	Perfil de actividad enzimática (%)	Perfil de actividad enzimática (%)
Xilanasas	20-30 %	15-25 %	35-50 %	12-20 %
Exoxilanasas	5-10 %	2-5 %	10-15 %	2-8 %
β -xilósidasas	0,5-2,0%	0,2-1,5%	0,5-1,5%	0,1-1,0%
α -glucuronidasas	0,5-2,0%	0,2-1,5%	0,2-1,5%	0,2-1,5%
α -L-arabinofuranosidasas	0,5-2,0%	0,2-2,0%	0,2-1,2%	0,1-1,5%
Enzimas modificadoras de biopolímeros incluyendo acetil esterasa y acetil xilanas esterasa	30-45 %	32-50 %	20-35 %	25-60 %

Ejemplo 4: Sistema de *Talaromyces emersonii* para convertir materiales no celulósicos, tales como hojas de té y polvo de Algarroba. Caracterización de tres endoglucanasas (EG) nuevas, que son importantes tanto para la modificación selectiva como para la degradación de una diversidad de restos de cereales, incluyendo posibles candidatos para la fabricación de cerveza y piensos animales, tales como sorgo, maíz y centeno. Estas tres enzimas se han purificado a partir de *Talaromyces emersonii*, cepa IMI393751.

El contenido total de carbohidratos de las preparaciones enzimáticas purificadas se determinó mediante el procedimiento de ácido fenolsulfúrico (Dubois y col) por referencia a las curvas patrón de glucosa o manosa (20-100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Técnicas de separación de proteínas. Para obtener preparaciones altamente purificadas de EG V, EG VI y EG VII se necesitaron la filtración en gel secuencial, el intercambio de iones, la interacción hidrófoba, cromatografías de afinidad de lectina y cromatografía (pseudointercambio de iones). Se realizó electroforesis en gel no desnaturante e isoelectroenfoque seguido por tinción con azul de coomassie mediante metodología convencional conocida por el experto en este campo y proporcionada en las referencias relevantes (por ejemplo, Murria y col., 2001; Tuohy y Coughlan, 1992, Tuohy y col. 2002; Maloney y col., 2004). Los experimentos iniciales revelaron que los valores de pI de EG V-VII fueron $< \text{pH } 3,5$. Por lo tanto, se usó cromatografía en PBE 94, pre-equilibrado con piperazina-HCl 0,025 M, pH 3,5, para determinar los valores de pI precisos para EG V-VII. Se determinó que el pH correspondiente al pico de elución para la β -glucanasa era el pI. Pudieron detectarse diferencias de 0,01 unidades de pH produciendo de este modo valores de pI precisos para cada enzima.

pH y temperatura óptimos y estabildades. Se determinaron los valores de pH óptimos supervisando la actividad enzimática a valores de pH entre 2,5 y 9,0, a 50 °C, en tampón fosfato de citrato de fuerza iónica constante. Para evaluar los efectos del pH en la actividad de EG V-VII, se incubaron muestras purificadas de cada enzima a pH 4,0, 5,0 y 6,0 a 50 °C. Se extrajeron alícuotas después de 0, 1, 2, 3, 6, 9,12, 24, 36, 48 y hasta 336 horas (14 días), se diluyeron de forma apropiada en tampón de NaOAc 100 mM, pH 5,0 (pH de ensayo normal) y se ensayaron con respecto a la actividad residual de acuerdo con el procedimiento de ensayo convencional. La estabilidad de cada enzima purificada se investigó a 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C, en ausencia de sustrato. Las EG V-VII no fueron proteínas modulares porque ninguna de las tres enzimas se adsorbía en celulosa (u otros carbohidratos insolubles, es decir, no contenían unión a carbohidratos).

Se evaluó la especificidad de sustrato en diversos polisacáridos y glicósidos sintéticos midiendo la actividad frente a una amplia diversidad de carbohidratos (BBG, liquenano, CMC, otros polisacáridos y glicósidos sintéticos) usando el procedimiento de ensayo de β -glucanasa normal.

Efectos de iones metálicos, reactivos de modificación química y posibles inhibidores. Se investigó una serie de iones monovalentes, divalentes y de metales pesados, a concentraciones de ensayo final de 1,0 mM, con respecto a sus posibles efectos sobre las actividades de EG V, EG VI y EG VII, incubando las enzimas con los compuestos químicos y realizando después el ensayo enzimático normal. Finalmente, se examinaron los efectos inhibidores de los glicósidos, tales como disacáridos, lactonas y glicósidos flavonoides en las enzimas purificadas. Se incluyeron concentraciones específicas de cada glicósido en cócteles de ensayo normales y la actividad residual se determinó por comparación con controles (sin glicósido presente).

En la Tabla 5 se proporciona un resumen de la purificación de EG V, EG VI y EG VII, y parámetros de purificación tales como rendimiento (%).

Tabla 5: Resumen de la purificación de enzimas endoglucanasas de *Talaromyces emersonii*

Etapas de purificación	Actividad total (UI)	Proteína total (mg)	Actividad específica (UI.mg ⁻¹)	Factor de purificación (x veces)	Rendimiento (%)
Extracto en Bruto	54.806,2	573,1	95,6	1,00	100,00
Ultrafiltración (Amicon DC2)	50.613,4	452,2	111,9	1,17	92,30
Propan-2-ol pptn.	50.016,9	364,8	137,4	1,44	91,30
Intercambio de aniones (DE-52, pH 5,5)	25.064,7	240,1	104,4	1,10	45,70
Fenil Sepharose CL-4B	3.862,6	24,9	154,9	1,62	7,10
Pico 1	6.763,5	30,8	219,3	2,29	12,30
Pico 2	14.411,1	42,1	342,3	3,58	26,30
Pico 3					
<u>EG VII (Pico 1)</u>					
Concanavalina A	3.120,2	11,3	275,9	2,89	5,70
Sephacryl S-100 HR	670,1	3,2	212,5	2,22	1,20

(continuación)

Etapas de purificación	Actividad total (UI)	Proteína total (mg)	Actividad específica (UI.mg⁻¹)	Factor de purificación (x veces)	Rendimiento (%)
Cromatoforografía EGV, EGVI (Pico 3)	400,4	0,53	756,9	7,92	0,71
Intercambio de aniones (DE-52, pH 4,5)	4.662,3	10,40	447,4	4,68	8,50
Intercambio de aniones (DE-52, pH 7,0)	3.339,2	5,77	579,1	6,06	6,10
BioGel P-60 Concanavalina A	3.043,8	3,60	855,7	8,95	5,50
Pico 1	1.115,6	1,60	679,1	7,10	2,10
Pico 2	863,50	1,20	738,7	7,73	1,60
Cromatoforografía PBE 94, pH 3,5-2,0					
EG V	415,3	0,54	764,8	7,99	0,76
EGVI	168,7	0,18	947,6	9,09	0,31

Los rendimientos, así como los valores de actividad específica finales, fueron similares para EG V y EG VII, mientras que EG VI se obtuvo a un menor rendimiento y tuvo una mayor actividad específica.

5 **Valores de Mr y pl de homogeneidad enzimática.** La tinción positiva con reactivo de Schiff (resultados no mostrados) indicó que las tres enzimas eran glicoproteínas de una subunidad. La homogeneidad de cada preparación enzimática se verificó mediante IEF. Los valores de pl obtenidos fueron los siguientes EG V, 2,45; EG VI, 3,00; EG VII, 2,85.

10 **Pruebas de glicosilación y cálculo de coeficientes de extinción molar.** Los contenidos de carbohidratos totales (p/p) fueron $22,6 \pm 0,1$ %, $14,7 \pm 0,1$ % y $65,9 \pm 0,04$ % para EG V, EG VI y EG VII, respectivamente. Los valores de coeficiente de extinción molar calculados (ϵ_{280}) ($\text{mol.l}^{-1}\text{cm}^{-1}$) fueron $1,04 \times 10^{-5}$ para EG V, $8,80 \times 10^{-6}$ para EG VI y $7,05 \times 10^{-6}$ para EG VII.

15 **pH y temperatura óptimos y estabildades.** Las tres enzimas fueron activas a lo largo de intervalos de pH relativamente amplios pero mostraron valores óptimos a pH ácidos de 5,7, 5,4 y 5,7 para EG V, EG VI y EG VII, respectivamente. Se obtuvo un pH óptimo de 4,5 para la actividad de BBGasa en el extracto en bruto de *T. emersonii*. Resultó evidente aproximadamente el 75% de la actividad óptima entre pH 3,0 y 7,0 (EG V), pH 2,5 y 7,5 (EG VI) y pH 2,8 y 7,5 (EG VII).

20 **La liberación de azúcares reductores de BBG,** a pH 5,0, durante 10 min, a 30-90 °C. Los valores de temperatura óptimos para la actividad fueron 78,0 °C, 78,0 °C y 76,0 °C para EG V, EG VI y EG VII, respectivamente. Las energías de activación (E_a), calculadas a partir de representaciones de Arrhenius, fueron $21,2 \pm 0,05$ kJ.mol⁻¹ para EG V, $23,5 \pm 0,02$ kJ.mol⁻¹ para EG VI, y $26,7 \pm 0,05$ kJ.mol⁻¹ para EG VII.

25 El efecto del pH sobre la estabilidad enzimática se investigó a pH 5,0, pH 5,5 y pH 6,0 (a 50 °C y 70 °C). La estabilidad de pH fue mayor en el intervalo de pH 4,0-7,0, durante un periodo de incubación de 1 hora, con una reducción notable observada a pH < 4,0 y > 7,0. EG V no perdió actividad a pH 5,0 y a 50 °C durante un periodo de 15 días, mientras que EG VI y EG VII perdieron actividad mínima (13,0% y 11,5% respectivamente). Sin embargo, a 70 °C y el mismo pH, EG V, EG VI y EG VII perdieron 42%, 35% y 33% respectivamente, de la actividad original en cada muestra durante un periodo de 60 minutos. A pH 5,5 (50 °C), EG V, EG VI y EG VII perdieron 30%, 22% y 8% de sus actividades originales respectivas durante un periodo de 15 días, pero a 70 °C, EG V se desestabilizó más (reducción del 58% de la actividad original después de 60 minutos), mientras que la actividad de EG VI y EG VII después de 60 minutos fue muy similar a la obtenida después de incubación a pH 5,5 y 70 °C. EG V fue considerablemente menos estable a pH 6,0 y a 50 °C perdiendo el 63% de su actividad original en 15 días. EG VI y EG VII fueron considerablemente más estables al último pH con estabildades similares a las determinadas a pH 5,5 (30% de pérdida de actividad para ambas enzimas). Aumentando la temperatura de incubación a 70 °C, la actividad de EG V se redujo notablemente (65%) durante un periodo de incubación de 60 minutos (a pH 6,0), mientras que EG VII permaneció notablemente estable perdiendo solamente el 22% de su actividad original. Los valores de semivida ($T_{1/2}$) fueron mayores de 15 días a pH 5,0 y a 50 °C, mientras que a valores de 70 °C variaban de 67 minutos (EG V) a > 80 minutos (EG VI y EG VII).

Pruebas de la estructura modular. EG V, EG VI, y EG VII se adsorbieron débilmente a Avicel (celulosa microcristalina) a pH 5,0 y a 4 °C (adsorción del 8-15%); sin embargo, este grado de adsorción no es indicativo de la presencia de un módulo de unión a carbohidratos (CBM, *Carbohydrate Binding Module*).

Efecto de los iones metálicos, modificadores químicos y posibles inhibidores sobre la actividad enzimática.

Se investigaron los efectos de concentraciones finales 1 mM de una serie de cationes mono, di y multivalentes sobre la actividad de EG V, EG VI y EG VII. La actividad se expresó como un % en relación con un control (sin ión metálico presente en mezcla de incubación). En general, se cree que los iones metálicos pesados inactivan enzimas formando sales covalentes con cisteína, histidina o grupos carboxilo. Aunque varios de los iones metálicos, por ejemplo, Mg^{2+} , Zn^{2+} y Mo^{6+} potenciaron la actividad de las tres enzimas y los iones tales como Ag^+ , Fe^{2+} y especialmente Hg^{2+} redujeron notablemente la actividad de EG V-VII, se observaron diferencias notables entre enzimas con respecto a los efectos de otros iones metálicos. Las sales de cloruro de Na^+ y K^+ no tuvieron ningún efecto o estimularon ligeramente la actividad de cada enzima, por ejemplo K^+ aumentó la actividad de EG VII en un 20%, mientras que Na^+ potenció la actividad de EG V en >39%. Ba^{2+} y Ca^{2+} redujeron la actividad de EG V en 16,5% y 21,5-24,6%, respectivamente, mientras que ambos iones aumentaron la actividad de EG VI en 37,6% y 10%. Otros cationes divalentes, tales como, Cd^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} ejercieron un efecto inhibitorio notable en EG V (-26,5-77,4% de pérdida de actividad). La inhibición casi total de la actividad de las tres enzimas por Hg^{2+} sugiere la presencia de un grupo (o grupos) tiol esencial implicado en la catálisis. Se observó que la valencia modulaba la actividad, por ejemplo, Fe^{3+} ejercía un efecto negativo más fuerte sobre la actividad de las tres enzimas (35,4-88,0% de reducción de la actividad), a diferencia de Fe^{2+} , que potencia de hecho la actividad de EG V en 20%, tiene efectos mínimos sobre EG VII y reduce la actividad de EG VI en 38,6% (Fe^{3+} reduce la actividad de EG VI en 53,6-59,3%). La naturaleza del contra-anión, es decir, Cl^- frente a SO_4^{2-} tuvo un gran efecto sobre la actividad cuando se investigaron ambas sales de un anión particular. Las sales de SO_4^{2-} de Ca^{2+} y Fe^{3+} potenciaron selectivamente la actividad de EG VII ~2 veces y ~4,5 veces, respectivamente, en relación con la actividad observada con la sal de Cl^- correspondiente. Por el contrario, la sal de SO_4^{2-} de Mg^{2+} redujo notablemente la actividad de EG V (54,2%) y EG VI (50,1%) en relación con la sal Cl^- del mismo catión. Se ensayó una selección de reactivos que se sabe que modifican grupos R de aminoácidos con respecto a sus efectos sobre EG V, EG VI y EG VII, ambos en ausencia y presencia de sustrato (de esta manera pudieron observarse efectos protectores de sustrato) (véase la Tabla 6).

Tabla 6: Estudios de modificación química para identificar grupos de aminoácidos esenciales para la catálisis en EG V, EG VI y EG VII

Reactivo químico	Enzima + reactivo ^a			Sustrato + reactivo ^b		
	EGV	EV VI	EG VII	EGV	EV VI	EG VII
Control	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
DL-DTT	218,9	514,3	575,0	264,3	915,5	348,6
Ditioeritrol	270,6	657,2	773,8	271,9	917,90	360,9
Dimetilsulfóxido	125,5	124,3	194,0	93,6	141,7	100,0
Borohidruro sódico	96,1	125,0	194,0	81,5	104,8	82,8
Peryodato sódico	181,0	357,1	300,0	283,3	1001,2	469,7
Reactivo K de Woodward	162,7	280,0	305,9	121,1	266,7	143,0
Ácido tioglicólico	211,1	187,1	188,1	148,1	269,0	150,0
o-Ftalaldehído	106,1	100,0	155,0	94,6	139,0	98,8
N-bromosuccinimida (NBS)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
p-cloromercuribenzoato	125,4	115,4	105,4	89,7	107,1	91,6
p-hidroximercuribenzoato	92,8	98,3	99,5	261,7	125,0	94,8
Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio	97,5	97,6	98,5	89,1	97,4	100,0
Yodoacetamida	103,6	99,9	101,6	87,4	122,6	83,7
Yodo	143,4	180,6	200,0	97,2	147,6	104,8
Cisteína	163,8	170,4	196,5	237,8	370,20	367,7
1 ^a Incubación (30 minutos) Enzima +	2 ^a incubación	EG V	EGVI	EG VII (30 minutos) + NBS		
Control	X	100,0	100,0	100,0		
Cisteína	√	117,0	217,0	167,0		
DDT	√	204,3	140,0	94,6		
NBS	√	0,0	0,0	0,0		

^a Preincubación de enzima con reactivo durante 30 minutos (50 °C) antes de la adición de sustrato

^b Preincubación de sustrato con reactivo durante 30 minutos (50 °C) antes de la adición de sustrato

El fuerte efecto inhibitorio de la N-bromosuccinimida (NBS) sugiere la implicación del triptófano en la unión y/o catálisis. Sin embargo, el o-ftaldehído, otro reactivo modificador de triptófano no tiene efecto neto sobre la actividad de EG V, EG VI o EG VII, por lo tanto la NBS podría modificar otro resto de aminoácido con el que se sabe que tiene reactividad secundaria, por ejemplo, la cisteína. Además, la incapacidad del sustrato para proteger contra la inactivación de enzimas descartaría un papel directo para el triptófano en la unión o catálisis. Puesto que tanto la cisteína como el ditiotreitol (DTT) protegieron contra la inactivación, el efecto de la NBS puede deberse a reacciones secundarias, por ejemplo, oxidación de cisteína. Los reactivos de sulfidril yodoacetamida, p-hidroximercuribenzoato y N-etilmaleimida provocan poca o ninguna inhibición en presencia o ausencia de sustrato, lo que parecería sugerir que EG V, EG VI y EG VII no tienen grupos tiol esenciales. Sin embargo, la cisteína, DTT y ditiotreitol activan las tres enzimas, especialmente EG VI y EG VII, lo que puede sugerir la reducción de un disulfuro oxidado quizás durante la extracción y/o purificación enzimática, restaurando de este modo la conformación nativa.

de la región del sitio activo de la enzima, o la molécula enzimática en su conjunto. El borohidruro sódico, un agente reductor fuerte, inhibe las tres enzimas (especialmente EG VI) en presencia de sustrato. Por el contrario, la oxidación de otros grupos reactivos en el sitio activo mediante la acción de agentes oxidantes fuertes, tales como, peryodato sódico, yodo y ácido tioglicólico, potencian notablemente la actividad de las tres enzimas siendo los efectos más pronunciados con peryodato sódico y EG VI, en presencia de un sustrato. El reactivo K de Woodward, un reactivo modificador de carboxilato, potenció la actividad de EG V, EG VI y EG VII, siendo más eficaz en ausencia de sustrato.

En general, las sustancias fenólicas, tales como m-fenilfenol, (-)epicatequina, (+)catequina, ácido o-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sirínico y ácido tánico, por nombrar algunos de los compuestos ensayados, no tuvieron un efecto inhibitor notable sobre la actividad enzimática (en ausencia de sustrato) con la excepción del ácido tánico que es un inhibidor fuerte debido a su función precipitadora de proteínas. De hecho, algunos de los compuestos, por ejemplo, el ácido protocatecuico, ácido sirínico, ácido cafeico y alcohol polivinílico activaron notablemente las tres enzimas (resultados obtenidos durante la preincubación de enzima con inhibidor en ausencia de sustrato). Sin embargo, cuando se incubaron conjuntamente con la enzima y el sustrato, se observó que varios de los fenólicos efectuaban una reducción de la actividad de ~7-32% (el sustrato no protegió a ninguna de las enzimas contra el fuerte efecto del ácido tánico).

En general, la mayoría de los detergentes ensayados no dio como resultado pérdida de actividad enzimática. Sin embargo, el ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, Tween 20 y Tween 80 redujeron todos la actividad de EG V, en 47,7%, 22,7%, 12,7% y 30,8% respectivamente, cuando se preincubaron con enzima antes de la adición del sustrato. Con la excepción de Tween 80 (pérdida de actividad del 34,2%), la incubación simultánea con sustrato restauró la actividad completa. Se observó actividad potenciada cuando se incubaron sustrato, enzima y detergente (ácido desoxicólico, CHAPS, ácido taurodesoxicólico y ácido quenodesoxicólico) simultáneamente, por ejemplo, la actividad de EG VI aumentó > 2 veces en presencia de sustrato y ácido desoxicólico.

Los glicósidos, tales como salicina, esculina y arbutina, no tuvieron efecto aparente sobre la actividad de EG V-VII, al igual que los disacáridos melibiosa, maltosa, sacarosa y el alditol, sorbitol. Sin embargo, concentraciones de celobiosa de 50-75 mM inhibieron notablemente las tres enzimas, especialmente EG V, que también se inhibió por lactosa a concentraciones > de 75 mM. La lactosa también efectuó inhibición de ~50% de la actividad de BBGasa de EG VI y EG VII a concentraciones de ~120 mM. La glucono- δ -lactona y glucoheptono-1,4-lactona también inhibieron EG V-VII pero a concentraciones mucho mayores (de 500 a > de 750 mM para una inhibición al 50%).

Especificidad de sustrato. Los extractos en bruto de *T. emersonii*, catalizan la hidrólisis de una diversidad de polisacáridos incluyendo celulosa, CMC, BBG, laminarano, liquenano, xilano, pectina y un espectro de derivados de glicósidos sintéticos. Ninguna de las tres enzimas purificadas fueron activas contra derivados de 4-nitrofenilo de β -D-xilopiranosido o α -D-galactopiranosido (Tabla 7).

Tabla 7: Especificidades de sustrato de EG V, EG VI y EG VII purificadas de *Talaromyces emersonii*

Sustrato	Enlace	“liquenasa” de 40,7 kDa	% de Actividad relativa ^a		
			EG V	EG VI	EG VII
β -glucano de cebada	β -(1,3)(1,4)	100,0	100,0	100,0	100,0
DP BBG mixto	β -(1,3)(1,4)	159,0	165,0	230,0	107,6
DP BBG alto	β -(1,3)(1,4)	118,0	249,9	342,8	144,1
CMC	β -(1,4)	0,5 ^c	74,9	58,4	57,7
Liquenano	β -(1,3)(1,4)	118,9	204,3	177,7	166,9
Laminarano	β -(1,3)	0,0	0,0	21,3	18,1
Xilano	β -(1,4)	0,0	1,8	0,7	1,5
Rodimenano (xilano)	β -(1,3)(1,4)	0,0	35,4	9,3	0,0
Pectina	α -(1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
Manano	β -(1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
Avicel	β -(1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
Papel de Filtro	β -(1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
4NP- β -D-glucopiranosido	β -(1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
4NP- β -D-galactopiranosido	β -(1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0
4NP- β -D-xilopiranosido	β -(1,4)	0,0	0,0	0,0	0,0

^a % de actividad en relación con la actividad frente a BBG, que se toma como el 100%; ^bliquenasa de *Talaromyces emersonii* purificada [6]; ^c Después de 24 h a 50 °C

Además, EG V, EG VI y EG VII no presentaron ninguna actividad contra papel de filtro, Avicel, galactomanano de goma de algarrobo y no catalizaron la oxidación de celobiosa, incluso en incubación ampliada con sustrato. Los resultados se expresan en términos de % de actividad en relación con el control (a la actividad contra BBG se le asigna un valor de 100%). Las tres enzimas muestran actividad máxima contra los β -glucanos de enlace mixto, BBG y liquenano, notablemente con más actividad sobre el último sustrato. La actividad residual mostrada por las tres enzimas con xilano en periodos de incubación ampliados puede explicarse por el hecho de que la preparación usada de xilano de cascarillas de avena contenía menores cantidades contaminantes de β -glucano.

Después de realizar análisis similares en cada una de las enzimas expresadas, se diseñó un sistema enzimático usando enzimas purificadas a partir de *Talaromyces emersonii* para la degradación de material no celulósico, tal como hojas de té, polvo de algarrobo y otros materiales similares.

La Tabla 8 proporciona un ejemplo de las cantidades relativas de diferentes actividades enzimáticas para este sistema enzimático.

Tabla 8: Sistema para la conversión de materiales no celulósicos, por ejemplo, hojas de té, polvo de algarrobo.

Composición enzimática	Perfil de actividad enzimática (%)
β -glucanasa	45,0-55,0
Xilanasa	16,5-42,0
β -glucosidasa	0,5-2,0
β -xilosidasa	0,1-1,0
Proteasa	0,1-1,0
Enzimas hemicelulasas adicionales que incluyen β -galactosidasa, esterasas, α -glucuronidasa, etc.	10,0-18,0

Ejemplo 5: Sistema de *T. emersonii* para convertir celulosa, residuos ricos en celulosa y celooligosacáridos

Se cultivó la cepa IMI 393751 de *Talaromyces emersonii* en una diversidad de residuos de papel y productos de papel como sustratos. Las enzimas excretadas se extrajeron y se supervisó la expresión enzimática y se cuantificó por análisis de proteoma y transcriptoma y por un espectro exhaustivo de ensayos funcionales. Varios residuos de papel demostraron ser excelentes inductores de celulasas (y actividades complementarias, por ejemplo, enzimas que hidrolizan almidón, en las que se usaron productos revestidos/acabados de papel). Las diferencias fueron bastante evidentes con respecto a las cantidades relativas/tipos de enzimas celulasa inducidas por diferentes residuos/productos de papel. Los datos obtenidos confirmaron que las isoenzimas celobiohidrolasa I (CBH I) y celobiohidrolasa II (CBH II) eran las actividades celulasa más importantes y, cuando se deseaba sacarificación/bioconversión más completa de celulosa en el sustrato diana (por ejemplo generación de materias primas ricas en monosacáridos para producción de biocombustibles), también era muy importante la β -glucosidasa I (BG I).

Los platos de papel indujeron niveles notables de actividad degradadora de papel de filtro (FP) (1573 UI/g, en la que UI representa μ moles de producto formado/minutos de tiempo de reacción/g de sustrato inductor), bajos niveles de endocelulasa (27,5 UI/g) y bajos niveles de β -glucosidasa (6,05 UI/g). En el nivel del transcriptoma, la CBH I era la celulasa más abundante/altamente expresada, una observación complementada a nivel funcional detectándose actividad de tipo CBH I 242,0 UI/g. Las enzimas producidas durante el crecimiento en vasos de papel fueron significativamente más exoactivas, detectándose actividad FP 495,0 UI/g y β -glucosidasa 53,9 UI/g. En el último ejemplo, la expresión génica y los ensayos funcionales indicaron que la CBH II era la celulasa clave (los niveles de transcripto y enzima para CBH II fueron ~2 veces los niveles correspondientes para las enzimas CBH I). La CBH II fue de nuevo la celulasa clave inducida por papel de color marrón, cartón corrugado y papel de oficina blanco. Se mostró que los sistemas enzimáticos individuales, y sus combinaciones (por ejemplo para la amplificación de actividades accesorias/secundarias o externas clave), eran herramientas eficaces para la conversión de celulosa (y hemicelulosas/otros carbohidratos) en una amplia diversidad de materiales vírgenes, secundarios y residuales ricos en celulosa.

Las enzimas se aislaron y analizaron por procedimientos convencionales (Walsh, (1997) y col., 2002).

CBH IA, que contiene restos de xilanasa como única actividad contaminante, eluyó a una concentración de NaCl entre 115 y 170 mM. Las fracciones 52-66 se agruparon y se dializaron durante 16 horas frente a 4 cambios de tampón de acetato de amonio 100 mM, pH 5,0, y se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna (1,4 x 11,3 cm) de CH Sepharose 4B sustituida con p-aminobencil-1-tio-celobiósido. La actividad xilanasa contaminante residual no se unió y se eluyó en la aplicación y tampones de lavado. Usando lactosa 0,1 M en tampón de acetato de amonio 100 mM, pH 5,0, se eluyó CBH IA. Las fracciones 13-21 se agruparon, se dializaron frente a agua destilada para retirar la lactosa y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

CBH IB de la etapa de intercambio aniónico (DE 52 a pH 5,5) se dializó frente a tampón de acetato de amonio 100 mM, pH 5,5 y se aplicó a la columna de afinidad como para BCH IA. Las actividades contaminantes residuales, principalmente endoglucanasa, no se unieron a la matriz de afinidad y se eluyeron en el lavado. CBH IB se eluyó específicamente usando lactosa 0,1 M en tampón de afinidad. Las fracciones 43-48 se agruparon y se dializaron frente a agua destilada para retirar la lactosa y se conservaron a 4 °C hasta su uso posterior.

Basándose en el análisis anterior, se diseñó el siguiente sistema enzimático usando enzimas purificadas de *Talaromyces emersonii* para la degradación de residuos de papel y productos de papel, y otros residuos que contienen celooligosacáridos.

Tabla 9: Sistema para la conversión de celulosa, residuos ricos en celulosa y celooligosacáridos

Composición enzimática	Perfil de actividad enzimática (%)
Celobiohidrolasa 1A y 1B	5,0-80,0
Celobiohidrolasa II	6,0-45,0
Endoglucanasa (Cel 45, EGV, EGVII, EGVIII)	4,6-66,0
β -xilosidasa	0,1-2,5
Xilanasa	1,0-89,0
Otras hidrolasas (incluyendo enzimas modificadoras de pectina, arabinofuranosidasa, β -galactosidasa)	1,2-20,5

Ejemplo 6: Sistema de especies fúngicas termófilas, *Chaetomium thermophile* y *Thermoascus aurantiacus*.

La estrategia descrita para el diseño de sistemas enzimáticos/composiciones termoenzimáticas de la cepa IMI 393751 de *T. emersonii* y mutantes previamente conocidos se adaptó para la producción de composiciones modificadoras de carbohidratos por más de veintitrés especies fúngicas mesófilas y termófilas. Se prestó especial atención a la producción/inducción de fuertes sistemas enzimáticos ricos en pectinasa y hemicelulasa (xilanasa, mananasa) por estas especies fúngicas.

Las especies *Chaetomium thermophile* y *Thermoascus aurantiacus* se cultivaron individualmente en fermentación líquida, como se ha descrito anteriormente, en el medio nutriente de *T. emersonii* que contenía 1-6% de fuente de carbono inductora (también se investigó la producción enzimática por fermentación sólida). Se obtuvo un fuerte sistema enzimático que degradaba manano por cultivo de *C. thermophile* durante 96-120 horas en residuos de café. Esta composición de este sistema se caracterizó y se mostró que contenía 45-60% de actividades de hidrólisis de manano, 0,7-4,0% de enzimas modificadoras de pectina, 35,2-52,0% de actividades modificadoras de xilano atribuyéndose el resto a actividades celulasa (se observaron CBH y β -glucosidasa muy bajas o residuales).

El cultivo del mismo hongo en salvado de soja produjo un fuerte sistema enzimático xilanolítico (atribuyéndose el 70,2-86,5% de las actividades totales a enzimas modificadoras de xilano); se atribuyeron ~10,6-28,0% y ~8,6-22,5% de las actividades modificadoras de carbohidratos restantes a enzimas celulasas, pectinolíticas y niveles bajos de mananolíticas.

De forma similar, durante el cultivo de *Th. aurantiacus* en salvado de trigo y pulpa de remolacha (1:1), se indujo un fuerte sistema enzimático modificador de pectina, representándose > 56,5-80,0% del perfil de actividad modificadora de carbohidratos total por actividades pectinolíticas; este sistema enzimático también contenía ~22,1-40,1% de enzimas modificadoras de xilano, siendo el resto principalmente actividades modificadoras de β -glucano/celulasa. Por el contrario, el cultivo de *Th. aurantiacus* en salvado de soja indujo un fuerte sistema enzimático xilanolítico (> 62,1-85,8%), complementado por enzimas modificadoras de pectina ~3,5-11,0% siendo las actividades restantes predominantemente modificadoras de β -glucano. A diferencia de *C. thermophile*, *Th. aurantiacus* no procesó niveles significativos de enzimas degradantes de manano durante el cultivo en uno de los sustratos.

Se ha mostrado que estos sistemas, por sí mismos y en combinación entre sí o con otros sistemas enzimáticos (por ejemplo, *T. emersonii*) efectúan abundante sacarificación (liberación de azúcar) de una amplia diversidad de materiales agrícolas, alimentarios/vegetales, de bebidas, leñosos/de papel y otros vírgenes ricos en carbohidratos y de residuos diferentes, y pueden usarse para la generación de productos oligosacáridos especializados o materias primas ricas en azúcares para una amplia serie de aplicaciones biotecnológicas (por ejemplo, producción de biocombustible).

Ejemplo 7: Sistema de *T. emersonii* para la generación de materias primas ricas en azúcares a partir de residuos de alimento/bebida, papel y leñosos para usar en la producción de biocombustible.

(a) Bioconversión de un residuo de alimento/bebida: pulpa/orujo de manzana

A partir de proveedores de fruta locales, distribuidores de procesamiento de alimentos y de producción de sidra/bebidas, se obtuvieron residuos de manzanas (reducidas a pulpa), pulpa y orujo de manzana. Se cultivó *T. emersonii* en orujo/pulpa de manzana al 2-6% (tanto por fermentación sólida como líquida) y se midieron altos niveles de una serie de enzimas modificadoras de carbohidratos. Este sistema se caracterizó por altos niveles de β -glucano hidrolasas, principalmente β -glucanasa no celulósica (~27,4% en filtrados de cultivo líquido de 120 horas), cantidades sustanciales de exoglicosidasas clave con niveles especialmente altos α -arabinofuronosidasa (13,3% de la actividad carbohidrasa total) y β -galactosidasa (22,6%). También se detectaron enzimas esterasa, modificadoras de pectina y xilano adicionales (> 7,2-33,5%). Por lo tanto usando el análisis anterior, es posible diseñar un sistema enzimático adecuado para degradar residuos de manzanas.

Los estudios iniciales usaron una carga enzimática que contenía 2.344 nkat de xilanasa, 5.472 nkat de β -glucanasa de enlace mixto y 8.529 nkat de liquenanasas por 3,6 kg de sustrato y se usó una temperatura de reacción de 70 °C. Se consiguió la pasteurización completa del hidrolizado a 70 °C, y se usó el hidrolizado para alimentar reactores anaerobios de flujo ascendente mesófilos y termófilos (UAHR). Se ha observado 100% de utilización de la materia prima de azúcar, con producción conjunta de metano (50-70% en la corriente de biogás). Se realizaron estudios de optimización posteriores, que demostraron que la incubación a 80 °C, con agitación suave (~120 rpm) durante un periodo de 24 horas con aproximadamente 2/3 de la dosificación de enzima original, consiguió ~87% de sacarificación de los carbohidratos presentes a azúcares fermentables sencillos.

Los azúcares producidos por este sistema enzimático pueden usarse como una materia prima rica en monosacáridos para la producción de biocombustible.

(b) Bioconversión de residuos de papel: vasos de papel y productos de papel

Se cultivó *T. emersonii* sin complementación en una diversidad de residuos de papel en fermentación líquida (véase el Ejemplo 5). Se demostró que los vasos de papel eran inductores de carbohidrasa muy eficaces, produciendo un cóctel enzimático multicomponente fuerte con altos niveles de actividades enzimáticas xilanasa y degradantes de almidón, y niveles de actividades celulasas mayores que los presentados en sustratos de crecimiento convencional. El potencial de este sistema enzimático para liberar eficazmente azúcares reductores y efectuar degradación de residuos de papel se ilustró claramente por ensayos bioquímicos y microscopía electrónica de barrido. El efecto del tratamiento termoenzimático en la integridad y morfología del sustrato usando microscopía electrónica de barrido confirmó el potencial de estos cócteles como herramientas biotecnológicas potentes para conversión de residuos de papel. La MEB (microscopía electrónica de barrido) proporcionó pruebas claras de una amplia degradación de fibras de celulosa (pérdida completa de estructura fibrosa en determinadas muestras) después del tratamiento del sustrato rico en celulosa con los cócteles de *T. emersonii*.

El cóctel enzimático producido por *T. emersonii* después de 108 horas de crecimiento en vasos de papel contiene una acumulación de celulosa, hemicelulosa y enzimas degradantes de almidón y los estudios de sacarificación realizados con este cóctel multi-componente demuestran su capacidad para liberar eficazmente glucosa y otros azúcares reductores de celulosa convencional y sustratos de residuos de papel. Se ha descubierto que este cóctel enzimático era activo en todos los sustratos de residuos de papel y celulosa convencional analizados. Aunque todos los sustratos se degradaban cada vez más con el tiempo se mostraron diferentes susceptibilidades de biodegradación en respuesta a las diferentes composiciones de sustrato.

Antes de cualquier tratamiento previo, el envasado biodegradable mostró la mayor susceptibilidad hacia la hidrólisis enzimática seguido del papel de seda, vasos de papel y cartón corrugado. El sistema enzimático inducido por vasos de papel, actúa de forma óptima, liberando niveles máximos de azúcares de los residuos de papel, a una temperatura de 50 °C, pH 4,5, a una dosificación enzimática de 4 ml/g de sustrato y con agitación a 37 rpm. La homogeneización de los vasos de papel aumentó el nivel de hidrólisis en 2,3 veces. En estas condiciones experimentales (dosificación enzimática de 36 UPF) (unidades de papel de filtro) se consiguió un % de hidrólisis total del 85%, representando la glucosa ~80% de los azúcares reductores liberados. La glucosa y la xilosa fueron los principales productos liberados (véase la Figura 3). Sin embargo, la reducción de la dosificación enzimática a 9 UPF efectuó una hidrólisis global de ~76%. La microscopía electrónica demostró las excelentes propiedades hidrolíticas de este cóctel (Figura 4).

El tratamiento térmico aumentó la conversión de cartón por el mismo sistema enzimático, en un factor del 34% (una hidrólisis de carbohidratos global basada en azúcares reductores liberados de ~88%), mientras que la combinación tanto del tratamiento térmico como de homogeneización aumentó los azúcares reductores liberados en 80% produciendo glucosa 1,47 mg/ml (31,7% de los azúcares totales liberados). Los platos de papel se degradaron rápidamente por el cóctel enzimático inducido por vasos de papel representando la glucosa ~67% de los azúcares totales liberados.

Se ha investigado la sacarificación enzimática de residuos de papel y alimentos en hidrólisis y sacarificación secuencial (SHF), es decir, pre-tratamiento enzimático seguido de fermentación con levaduras para producir etanol, y en hidrólisis y sacarificación simultáneas (SSF), en las que se genera de forma continua materia prima y se fermenta inmediatamente por levadura. Las temperaturas de reacción de pre-tratamiento enzimático son diferentes en ambos procedimientos, es decir, mayores en SHF ya que el hidrolizado se enfría antes de la fermentación y a

una temperatura cercana a las temperaturas ambiente para el crecimiento de levaduras y fermentación en SSF. Aunque las enzimas de la cepa IMI 393751 de *T. emersonii* son más eficientes y tienen mayores velocidades de reacción, y se consigue pasteurización (y se requiere menos enzima), las enzimas de *T. emersonii* aún funcionan bastante bien a 25-37 °C y se comparan bien con preparaciones enzimáticas comerciales de otras fuentes fúngicas. Se descubrió que las materias primas ricas en azúcares producidas eran adecuadas para la producción de biocombustible (bioetanol y biogás).

(c) Bioconversión de restos de coníferas para la producción de bioetanol

Los restos y residuos leñosos de fuentes primarias y secundarias (por ejemplo, corteza, residuos de aclareos y procesamiento, tales como virutas y serrín) representan un inmenso recurso comprendiendo hasta 65-70% de peso seco que comprende carbohidratos complejos tales como hemicelulosa (~19-28% y principalmente xilanos y mananos con algunos otros polisacáridos) y celulosa (~39-46%), que están revestidos de lignina.

Se cultivó la cepa IMI 393751 de *T. emersonii* en fermentación de estado líquido o sólido, en restos leñosos, tales como serrín y de píceas de Sitka y virutas de fresno para generar sistemas enzimáticos con el perfil apropiado de enzimas para la conversión de los residuos diana. Se investigaron diferentes temperaturas de reacción/pre-tratamiento y dosificaciones enzimáticas. Los sistemas enzimáticos evaluados incluyeron cócteles obtenidos durante el cultivo de *T. emersonii* en una diversidad de sustratos. Se investigaron temperaturas de reacción de 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C, y se usaron varios sustratos diferentes, es decir, restos leñosos no tratados y pre-tratados. También se investigó la carga enzimática, comenzando los estudios iniciales con 60 UPF, aumentada posteriormente a 200 UPF (UPF: unidades de papel de filtro, una medida de la actividad celulasa total).

Tabla 10: Sacarificación de restos leñosos por cóctel de WB/BP (1:1) de *T. emersonii*

Dosificación	Temperatura	Serrín de píceas de Sitka			Serrín de píceas de Sitka molido en trozos grandes		
		% de Hidrólisis	% de Conversión	Hexosa (g)	% de Hidrólisis	% de Conversión	Hexosa (g)
60 UPF	50°C	34,3	40,9	0,39	35,2	27,0	0,24
60 UPF	80°C	44,3	50,6	0,49	48,1	39,5	0,38
60 UPF de mezcla*	50°C	48,7	62,3	2,95	41,8	35,1	1,87
60 UPF de mezcla*	80°C	62,4	79,1	3,45	55,9	65,2	3,1

El contenido de hexosa se proporciona como gramos liberados a partir de un lote de partida de 10 g en un periodo de reacción de 24 horas

*Mezcla= Se investigó la hidrólisis inducida por el cóctel de (WB/BP (1:1) de *T. emersonii* + residuos de café de *C. thermophile* en condiciones tamponadas y no tamponadas, así como el efecto de los niveles de humedad de la reacción y la dosificación enzimática.

En la Tabla 11 se presentan los efectos de la dosificación enzimática sobre los rendimientos de etanol teóricos.

Tabla 11: Efecto de la dosificación enzimática sobre el % de conversión y rendimiento de etanol teórico

Enzima	Dosificación (UPF)	Temperatura de reacción	Hexosa liberada (g)	% de conversión	Rendimiento de etanol teórico (l/ton de materia prima)
Mezcla*	60	70 °C	4,5	70,0	325,5
Mezcla*	200	70 °C	5,1	76,4	345,4

*Mezcla = Inducido por cóctel (WB/BP (1:1) de *T. emersonii* + residuos de café de *C. Thermophile*; el contenido de hexosa se proporciona como gramos liberados a partir de un lote de partida de 10 g en un periodo de reacción de 24 horas

Ejemplo 8: Sacarificación de biomasa leñosa

Preparación del sustrato de ensayo. Se impregnaron astillas de píceas (2-10 mm de diámetro) con dióxido de azufre (humedad 3% p/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente a una tasa de absorción de 2,5% p/p de humedad. La píceas tratada con SO₂ se trató con vapor a 215 °C durante 2-5 minutos. El contenido de hemicelulosa se hidrolizó casi completamente; la recuperación de sólidos fue del 60-65% de la materia prima de partida. **Enzimas** Termoenzimas MGBG: MGBG 1, MGBG 2, MGBG 3 y MGBG 4 numeradas. Se usaron las enzimas comerciales Celluclast 2 I de *T. reesei* y Novozym 188 de *A. niger* (Novo Industri A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).

Evaluación de hidrólisis enzimática

En recipientes de reacción de 300 ml, 1 l y 10 l, con agitación a ~130 rpm, se realizó la hidrólisis enzimática convencional a 37 °C, 50 °C y 60 °C. La dosificación enzimática de cada enzima fue de 32 UPF por g de celulosa en una solución de sustrato tamponada (Gillera, 2004). El pH del tampón de reacción se ajustó a pH 5,0 para las enzimas MGBG y a pH 4,8 para las preparaciones comerciales. Las muestras se retiraron a intervalos temporales y la acción enzimática finalizó hirviendo cada mezcla de reacción (y controles) durante 10 minutos. A las temperaturas de reacción más bajas (37-50 °C), 2 de las preparaciones enzimáticas de la invención rindieron tan bien como la preparación comercial Celluclast, y (ii) el rendimiento de 3 de las enzimas MGBG está en el mismo intervalo que el de Celluclast comercial (y mezcla Celluclast/Novozym).

El rendimiento de glucosa usando la composición de la invención fue similar al de las preparaciones comerciales optimizadas pero produjeron mayores niveles de azúcares fermentables adicionales que las enzimas comerciales.

Las preparaciones enzimáticas de la invención rindieron mejor que las enzimas/combinaciones de enzimas comerciales a mayores condiciones de reacción (60-70 °C), en cuanto al grado global de hidrólisis, rendimiento de producto y estabilidad enzimática. Pudo usarse una dosificación enzimática más baja a mayores temperaturas de reacción para conseguir un rendimiento similar de hidrólisis (dependiendo de la preparación enzimática, sólo se necesitó el 62,5 - 78% de la carga de enzima comercial). También se ven menos afectadas por sustancias inhibitoras presentes en el sustrato previamente tratado con vapor y mayores concentraciones de glucosa y celobiosa en los hidrolizados ricos en azúcares. También produjeron una mayor cantidad de azúcar en 24 horas a 60 °C, en comparación con la conseguida por las enzimas comerciales en 72 horas a 50 °C, que es la temperatura de funcionamiento óptima para las enzimas comerciales.

En la Tabla 12 se presentan los resultados clave para la hidrólisis enzimática, mientras que en la Tabla 13 se muestran las mejores combinaciones de temperatura de reacción/tiempo de reacción para el % de hidrólisis óptimo, para cada una de las composiciones comerciales y enzimáticas de la invención ensayadas.

Tabla 12: Resumen de resultados comparando el rendimiento enzimático/potencial hidrolítico de las preparaciones enzimáticas comerciales y de MGBG en picea pre-tratado

Temp. de reacción (°C)	Tiempo de reacción (h)	Criterios de valoración/productos (g/l)	Celluclast	Cell + Novozym (24:4)	MGBG 1	MGBG 2	MGBG 3	MGBG 4
50 °C	24 h	Hexosa	7.33	13.85	6.8	11.9	3.84	8.64
		Pentosa	0.83	0	1.1	1.93	0.59	1.33
		Celobiosa	2.58	0	1.22	2.14	1.28	2.88
		% de Hidrólisis*	40.2	51.9	34.1	59.8	21.4	48.1
	48 h	Hexosa	14.1	20.4	14.45	15.75	7.7	15.55
		Pentosa	1.59	1.1	2.34	2.55	1.18	2.52
		Celobiosa	4.96	0.6	1.01	0.3	2.57	0.35
		% de Hidrólisis	77.3	82.7	66.6	69.6	42.9	69.0
	72 h	Hexosa	12.98	20.8	21.25	21.48	9.16	20.84
		Pentosa	2.26	2.34	3.4	3.47	1.40	3.88
		Celobiosa	1.33	0.3	0.93	0.12	3.05	0.16
		% de Hidrólisis	62.0	87.8	95.8	93.9	51.0	91.3
	24 h	Hexosa	4.18	3.74	20.55	22.12	4.65	10.46
		Pentosa	0.47	0.31	2.1	1.87	0.71	1.49
		Celobiosa	1.47	0.17	3.69	1.34	1.55	3.61
		% Hidrólisis	22.9	15.8	98.6	94.8	25.9	58.3
60 °C	48 h	Hexosa	8.04	11.86	22.71	23.02	9.32	17.38
		Pentosa	0.9	0.63	2.47	2.55	1.43	2.67

(continuación)

Temp. de reacción (°C)	Tiempo de reacción (h)	Criterios de valoración/productos (g/l)	Cellulclast	Cell + Novozym (24:4)	MGBG 1	MGBG 2	MGBG 3	MGBG 4
		Celobiosa	2.83	0.34	1.31	0.39	3.11	5.80
		% de Hidrólisis	44.1	48.0	-100.0	97.2	51.9	96.8
	72 h	Hexosa	12.98	14.80	23.51	23.33	12.56	21.9
		Pentosa	2.26	1.33	2.53	2.67	1.92	2.43
		Celobiosa	1.33	0.17	0.85	0.17	5.7	1.34
		% de Hidrólisis	62.0	61.3	-100.0	98.0	75.6	96.1
70 °C	24 h**	Hexosa	1.2	1.07	21.72	24.11	16.8	20.98
		Pentosa	0.14	0.09	2.39	2.07	2.58	2.73
		Celobiosa	0.42	0.05	2.43	0.55	5.60	2.44
		% Hidrólisis	6.6	4.5	99.4	-100.0	93.5	97.9
*% de hidrólisis: azúcares totales liberados expresados como un % de los azúcares disponibles totales en el sustrato;								
** no se mostraron los puntos temporales posteriores ya que las enzimas MGBG no consiguieron hidrólisis completa								

Tabla 13: Combinaciones de temperatura de reacción/tiempo de reacción para el % de hidrólisis máximo, para cada una de las enzimas comerciales y MGBG investigadas

Preparación enzimática	Temperatura de reacción óptima (°C)	Tiempo de reacción óptima (h)	% de hidrólisis	Hexosa g/l
Celluclast	50,0	48 h	77,3	14,1
Cell + Novozym (24:4)	50,0	48 h	82,7	20,4
	50,0	72 h	87,8	20,8
MGBG 1	50,0	48 h	66,6	14,45
	50,0	72 h	95,8	21,25
	60,0	24 h	98,6	20,55
	70,0	24 h	99,4	21,72
MGBG 2	60,0	24 h	94,8	22,12
	70,0	24 h	-100,0	24,11
MGBG 3	70,0	24 h	93,5	16,8
MGBG 4	70,0	24 h	97,9	20,98
	70,0	48 h	96,8	17,38

5 Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

Se realizaron experimentos de SSF discontinuos con hidrolizado de píceas para comparar el rendimiento de diferentes preparaciones enzimáticas. Se realizó fermentación a una concentración de fibras de píceas del 4%, el material pre-tratado se diluyó con agua estéril a la concentración deseada. El pH se mantuvo a 5,0 con la adición de

NaOH 2 M. La temperatura de fermentación fue de 37 °C y la velocidad de agitación fue de 500 rpm. El medio reactor se roció con nitrógeno (600 ml/minuto) y se midió el contenido de CO₂ con un analizador de gases. Se añadió la preparación enzimática directamente al fermentador a una carga de 25 unidades de papel de filtro (UPF)/g de celulosa. El medio de fermentación se complementó con nutrientes: (NH₄)₂HPO₄ 0,5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,025 g/l y 1,0 g/l de extracto de levadura. La concentración de masa celular de levadura (levadura de panadero, *Saccharomyces cerevisiae*) añadida fue de 5 g/l y todos los experimentos de SSF se realizaron a 37 °C durante 72 horas. Las muestras se retiraron a diversos intervalos de tiempo, se centrifugaron en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml a 14.000 g durante 5 minutos (Z 160 M; Hemle Labortechnik, Alemania), el sobrenadante se preparó después para análisis de HPLC.

Se analizaron productos de hidrólisis generados durante la degradación de materiales lignocelulósicos por HPLC. Se separaron, la celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, manosa, HMF y furfural en una columna polimérica (Aminex HPX-87P) a 85 °C, la fase móvil fue agua millipore a un caudal de 0,5 ml/minuto. Se determinaron las concentraciones de etanol, glicerol y acetato usando una columna Aminex HPX-87H a 60 °C, usando un sistema de HPLC Shimadzu equipado con un detector de índice refractario. La fase móvil fue una solución acuosa 5 mM de H₂SO₄ a un caudal de 0,5 ml/minuto. También se determinó el etanol producido usando un ensayo ligado a enzima (r-Biopharm, Alemania).

El crecimiento de levaduras tiene lugar en dos fases. El dióxido de carbono es un producto secundario importante del proceso de fermentación de etanol ya que la fermentación anaerobia de un mol de glucosa produce un mol de etanol y dos moles de dióxido de carbono. Por lo tanto, la medición de la concentración de dióxido de carbono en el gas de salida es una medición indirecta de la tasa de fermentación. En la primera fase de crecimiento se consume la glucosa disponible y se forma etanol, y se representa la respuesta rápida inicial a la glucosa presente por un aumento en la evolución del CO₂.

Los resultados obtenidos durante la SSF se proporcionan en la Tabla 3. Como se ha mencionado anteriormente, el tiempo total transcurrido para la SSF, para cada preparación enzimática fue de 72 horas, y la temperatura usada para la SSF fue de 37 °C. La eficacia de la fermentación se determinó dividiendo la concentración real de etanol producido (g/l) entre el etanol teórico total (g/l) que se produciría si todo el sustrato disponible se convirtiera en azúcar soluble fermentable y todo el azúcar se convirtiera a etanol, y multiplicando por 100.

Basándose en los datos obtenidos, los rendimientos de etanol para cada combinación de enzima/SSF se proporcionan en litros de etanol/tonelada en seco, y las unidades correspondientes, litros de etanol/toneladas en seco.

Tabla 14: Resumen de los experimentos de SSF

Preparación enzimática	Etanol g/l	Eficacia de fermentación (%)	Rendimiento de etanol (l/tonelada)	Rendimiento de etanol (l /tonelada)	Coste de la enzima (\$ estadounidenses/tonelada)
Cell + Novo (24: 4) #1	5,83	54,0	178,78	215,68	No disponible
Cell + Novo (24: 4) #2	9,10	84,3	279,05	334,94	No disponible
MGBG 1*	5,02	46,5	153,88	185,6	~17 US \$
MGBG 1	7,33	67,9	224,62	270,97	~21,76 US \$
MGBG 2*	7,24	67,1	221,89	267,68	~16,8 US \$
MGBG 2	7,89	73,1	241,79	291,68	~23 US \$
MGBG 3**	8,62	79,9	264,46	319,01	~17,4 US \$
MGBG 4**	9,67	89,6	296,37	357,54	~15,4 US \$
* Se usó una carga enzimática de 21,3 UPF en lugar de 32,0 UPF					
** Mezclas más optimizadas de MGBG 3 y MGBG 4.					

Ejemplo 9: Comparación de las enzimas comerciales y MGBG en una estrategia de hidrólisis y fermentación secuenciales (SHF) para producción de bioetanol.

Se investigaron los rendimientos de bioetanol obtenidos por hidrólisis y fermentación secuenciales, para las preparaciones comerciales y enzimáticas de la invención. Una ventaja de la SSF, es que el procedimiento consiste en una fermentación rápida inicial y metabolismo de azúcares monoméricos resultantes de la etapa de pre-tratamiento. Se libera una glucosa del sustrato mediante la acción de las enzimas hidrolíticas que se han añadido, la fermentación es rápida, lo que significa que, en la SSF, la concentración de azúcares libres siempre permanece baja. En la SSF, la velocidad de fermentación disminuye con el tiempo como resultado de una disminución de la velocidad de conversión de sustrato por las enzimas, o inhibición del metabolismo de las levaduras, el que sea limitante para la velocidad. Los datos obtenidos en estos experimentos se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Resumen de experimentos de SHF

Preparación enzimática	Temperatura y tiempo de hidrólisis	Etanol g/l	Eficacia de fermentación (%)	Rendimiento de etanol (l/tonelada)	Rendimiento de etanol (l/tonelada)	Coste de la enzima (\$ estadounidenses/tonelada)
Celluclast	50 °C durante 48 h	7,21	66,8	220,94	269,55	No disponible
Cell + Novo (24:4)# 1	50 °C durante 48 h	9,35	86,7	286,7	345,89	No disponible
Cell + Novo (24:4)#2	50 °C durante 48 h	10,42	96,6	319,53	385,45	No disponible
MGBG 1	60 °C durante 24 h	10,50	93,37	321,98	388,40	~21,76 US \$
MGBG 1 *	70 °C durante 24 h	11,10	-100,0	340,38	410,62	~21,76 US \$
MGBG 2	60 °C durante 24 h	11,30	-100,0	346,51	418,05	~21,8 US \$
MGBG 2*	70 °C durante 24 h	12,32	>100,0**	377,79	455,91	~21,8 US \$
MGBG3%	70 °C durante 24 h	8,59	79,6	263,26	317,40	21,4 US \$
MGBG 4	70 °C durante 24 h	10,72	99,4	328,73	396,55	~21,4 US \$

* Preparación enzimática usada a temperatura de reacción mayor. % Este cóctel enzimático es particularmente eficaz en la liberación de azúcares fermentables de sustratos ricos en hemicelulosa y no se esperaría que fuera tan eficaz en un sustrato que tiene una parte significativa de la fracción de hemicelulosa retirada (etapa de pre-tratamiento).

El análisis de HPLC confirmó que los principales productos formados son monosacáridos (azúcares sencillos) con cantidades muy pequeñas de oligómeros mayores formados (siendo la celobiosa, que es un disacárido, el principal, o único, azúcar de cadena mayor presente en los hidrolizados).

Ejemplo 10 Aplicaciones para piensos animales:

Cada composición enzimática se evaluó en aplicaciones diana individuales, realizándose estudios modelo a escala de laboratorio con 5-25 gramos del sustrato (cereal, harina de cereal u otro resto vegetal) en volúmenes de reacción final de 50-250 ml, a pH 2,5-7,0 y a 37-85 °C, con o sin agitación. Se evaluó el rendimiento enzimático con y sin pre-tratamiento de sustrato, es decir pre-tratamiento de vapor suave (105 °C, 55,16 kPa (8 p.s.i.) durante 5 minutos), molienda usando un mortero, homogeneización en un homogeneizador Parvalux o Ultraturrax. Para tejidos/restos de verduras y frutas blandas, el sustrato se maceró sin mucha precisión, mezclando, y se incubó con enzima, sin pre-tratamiento. La hidrólisis del sustrato se supervisó mediante (i) medición de azúcares reductores liberados y ensayos para detectar y cuantificar azúcares individuales, (ii) análisis de TLC y HPLC de confirmación de los azúcares productos de hidrólisis, (iii) análisis de reducción de peso/volumen del resto, (iv) comparación de contenidos de celulosa, hemicelulosa, almidón y pectina antes y después del tratamiento enzimático, y (v) análisis físico de la degradación del sustrato mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) para sustratos fibrosos tales como papel y residuos leñosos.

Tabla 16

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 15	CBH I (25-30%) CBH II (1-5%) β (1,3)4-glucanasa (10-15%) β -glucosidasa (2-10%) Xilanasa (44-48%) β -Xilosidasa 0,1-1,5%, α -Glucuronidasa 0,1-2,0 % α -L-arabinofuranosidasa 0,1-1,5%; enzimas peptinolíticas y esterasas 2-5% proteasa 7-15%	Digestibilidad potenciada	Trigo, avena	>60 °C (hasta 75 °C)	Principalmente glucooligosacáridos, xilooligosacáridos y algunas otras cantidades menores de diversos azúcares
MGBG 16	CBH I (10-15%) CBH II (10-15%) β (1,3)4-glucanasa (25-30%) β -glucosidasa (2-8%) Xilanasa (25-30%) β -Xilosidasa 1-2,0%, α -Glucuronidasa 1-2,0 % α -L-arabinofuranosidasa 0,1-2,0%; enzimas peptinolíticas 5-10%, actividad modificadora de almidón ~5%; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 5-10% proteasa 10-15%	Digestibilidad potenciada Piensos enriquecidos en Galacto- y Glucooligosacáridos Liberación de antioxidante	Trigo; avena; centeno	>60 °C (hasta 80-85 °C)	Galactooligosacáridos, glucooligosacáridos y xilooligosacáridos

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 17	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (20-30%) β - glucosidasa (2-8%) Xilanasa (30-35%) β -Xilosidasa 1-2,0%, α -Glucuronidasa 1-3,0% α -L-arabinofuranosidasa 1,5-4,0%; enzimas peptinolíticas 5-10%, actividad modificadora de almidón 5-8%; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 1-4%, proteasa 18-25%	Digestibilidad potenciada	Trigo; avena; centeno; maíz; cebada; colza	>60°C (hasta 80°C)	Glucoligosacáridos y xilooligosacáridos
MGBG 13	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (25-40%) β -glucosidasa (~5%) Xilanasa (18-25%) β -Xilosidasa 1-2,0%, Exoxilanasa 1-3,0%, α -Glucuronidasa 8-10%, α -L-arabinofuranosidasa 1,5-5,0%; enzimas peptinolíticas 10-15%, actividad modificadora de almidón 5-7%; otras hemicelulasas 5-10%, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 1-4%, proteasa 8-12%	Digestibilidad potenciada Liberación de antioxidantes	Trigo; avena; centeno; maíz; cebada; colza	>60°C (hasta 85/90°C)	Glucoligosacáridos y xilooligosacáridos, algunos monosacáridos y disacáridos de polímeros de pectina (por ejemplo arabinooligosacáridos, ácido galacturónico, ramnosa, etc.)

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 19	CBH I (10-15%) CBH II (10-15%) β (1,3)4-glucanasa (25-30%) β -glucosidasa (~10-15%) Xilanasa (20-27%) β -Xilosidasa 4,0-7,0%, Exoxilanasa 5-10%, α -Glucuronidasa 1-4% α -L-arabinofuranosidasa 2,0-5,0%; enzimas peptinolíticas 5%, actividad modificadora de almidón ~5%, otras hemicelulasas ~5%, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 1-4%, proteasa ~25%	Digestibilidad potenciada; Flexibilidad para usar diferentes piensos	Sorgo; colza; también otros cereales, por ejemplo trigo; avena; centeno; maíz; cebada	>60°C (hasta 80/85°C)	Glucoligosacáridos y xiloligosacáridos, algunos monosacáridos o algunas otras cantidades menores de azúcares de polímeros pépticos

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 20	CBHI (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (20-32%) β -glucosidasa (~2-9,5%) Xilanasa (15-25%) β -Xilosidasa 15-20,0%, Exoxilanasa 10-15%, α -Glucuronidasa 2-5%, α -L-Arabinofuranosidasa 1,5-5%; enzimas peptinolíticas 10-15%, actividad modificadora de almidón ~10%; otras hemicelulasas ~5%, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 2-5%, proteasa ~7-10%	Digestibilidad potenciada;	Trigo, cebada y centeno	>60°C (hasta 80/85°C)	Glucoligosacáridos y xiloligosacáridos o algunas otras cantidades menores de azúcares de polímeros pépticos

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 21	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (15%) β -glucosidasa (~2-10%) Xilanasa (50-55%) Xilosidasa 1-5%; Exoxilanasa 5-10%, α -Glucuronidasa 1-4%, α -L-Arabinofuranosidasa 2-5%; enzimas peptinolíticas 20-25%, actividad modificadora de almidón 4-6%; otras hemicelulasas 7-10%, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 2-4%, proteasa ~10%	Digestibilidad potenciada; Liberación de fructooligosacáridos	Trigo, cebada y maíz; también pulpa de remolacha	>60°C (hasta 80/85°C)	Glucoligosacáridos, xilooligosacáridos, algunos monosacáridos o algunas otras cantidades menores de azúcares de polímeros pépticos y fructooligosacáridos

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 22	CBH I (~5%) CBH II (~5%) β(1-3)4-glucanasa (27-45%) β-glucosidasa (~1-5%) Xilanasa (16-25%) Xilosidasa 0,5-4%, Exoxilanasa ~10%, α-Glucuronidasa 0,5-4%, α-L-Arabinofuranosidasa 1-5%; enzimas peptinolíticas 5-10%, actividad modificadora de almidón 4-8%; otras hemicelulasas 8-10%, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 1-4% proteasa ~5-6%	Digestibilidad potenciada; Formación de glucooligosacáridos	Trigo, cebada, centeno	>60°C (hasta 85/90°C)	Glucooligosacáridos, xilooligosacáridos, algunos monosacáridos o algunas otras cantidades menores de azúcares, etc.

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 23	CBH I (~3-6%) CBH II (~3-6%) β(1,3)4-glucanasa (35-45%) β-glucosidasa (~3-6%) Xilanasa (~30%) Xilosidasa 0,5-2,0%, Exoxilanasa ~2-5%, α-Glucuronidasa 0,5-2%, α-L-Arabinofuranosidasa 1-5%; enzimas peptinolíticas 5-10%, actividad modificadora de almidón ~2-4%; otras hemicelulasas ~10%, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 6-10% proteasa ~8-10%	Digestibilidad potenciada; Glucooligosacárido, xilooligosacáridos Alto potencial de liberación de antioxidantes	Trigo, cebada, centeno	>60°C (hasta 85/90°C)	Glucooligosacáridos de DP bajo, xilooligosacáridos, con monosacáridos significativos o algunas otras cantidades menores de azúcares, etc.
Para piensos enriquecidos en oligosacáridos clave, por ejemplo Galactooligosacáridos - es mejor el cóctel enzimático de MGBG 16 Glucooligosacáridos - son mejores los MGBG 16 y 22 Fructooligosacáridos - es mejor el cóctel de MGBG 21					

Para preparaciones de piensos enriquecidos con antioxidantes, los mejores cócteles para usar para el tratamiento son los preparados en: MGBG 13, 16 y 23.

Ejemplo 11 Aplicaciones de piensos para animales monogástricos:

- 5 Se realizaron estudios a temperaturas en el intervalo 50-85 °C (con agitación a 140 rpm), con fracciones de cereales en bruto (lotes de 1-5 g). Se supervisó la hidrólisis de carbohidratos en el sustrato, por cada preparación enzimática (dosificación máxima 0,5 UI por g de sustrato), durante 24 horas cuantificando los azúcares reductores liberados, y productos formados en muestras retiradas de la mezcla de reacción a intervalos periódicos.

Tabla 17

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Productos
MGBG 24	CBH I (1-5%) CBH II (1-5%) β (1,3)4-glucanasa (27-43%) β -glucosidasa (2-10%) Xilanasa (44-48%) β -Xilosidasa 0,1-0,4%, α -Glucuronidasa 0,1-3,0% α -L-Arabinofuranosidasa 0,1-0,4%; enzimas peptinolíticas y esterasas 5-10% proteasa 20-25%	Digestibilidad potenciada. Producción de piensos basados en cereales fácilmente digeridos bajos en pentosa para aves de corral y cerdos, en los que se han reducido las propiedades de unión a agua de β -1,3; 1,4-glucanos viscosos mediante fragmentación enzimática	Cebada, mijo, trigo, avena. Dietas de cebada-soja. Dietas de maíz-trigo-soja. Dietas de trigo-centeno-soja	>60°C (hasta 85°C)	Principalmente glucooligosacáridos, xilooligosacáridos y algunas otras cantidades menores de diversos azúcares. Algunos de los productos oligosacáridos (y péptidos) tendrían propiedades reforzadoras para la salud
MGBG 17	Como antes				
MGBG 25	CBH I (0,5-2,5%) CBH II (0,5-2,5%) β (1,3)4-glucanasa (15-20%) β -glucosidasa (4-10%) Xilanasa (70-88%) β -Xilosidasa 0,1-0,4%, α -Glucuronidasa 0,1-2,0% α -L-Arabinofuranosidasa 0,1-1,0%; enzimas peptinolíticas y esterasas 1-6% proteasa 8-10%	Digestibilidad potenciada. Producción de piensos basados en cereales fácilmente digeridos bajos en pentosa para aves de corral y cerdos. Más del 30% de hidrólisis del β -glucano no celulósico presente en centeno, que se acompaña de una reducción notable de la viscosidad	Cebada, avena, centeno	>60°C (hasta 85°C)	Principalmente glucooligosacáridos, xilooligosacáridos (DP 2-6)

Se observó hidrólisis significativa del xilano y la fracción de β -glucano no celulósico, lo que dio como resultado la formación de productos de hidrólisis oligosacáridos de cadena media a alargada, que también serían sustratos de fermentación adecuados para microorganismo probióticos.

Ejemplo de producción de biogás

- 5 Se usaron dos reactores híbridos anaerobios de flujo superior de 10 l (UAHR; Reynolds, 1986), uno mantenido a 37 °C y el otro a 55 °C para producción de biogás por poblaciones mixtas individuales de bacterias mesófilas y termófilas, respectivamente. El hidrolizado rico en azúcares se bombeó a través del lecho de lodo y se degradó por las comunidades de microorganismos presentes. Se usó un dispositivo separador en la parte superior del reactor para separar el gas producido de cualquier partícula de lodo que pudiera haberse disgregado durante la digestión anaerobia. Ambos reactores se evaluaron continuamente durante un periodo de funcionamiento de 650 días supervisando la eficacia de la retirada de COD (APHA, 1992), reducción de carbohidratos total (procedimiento de Dubois) y producción de metano. Se supervisaron la producción de ácidos grasos, un indicador de metabolismo de azúcares, y la producción de metano por cromatografía de gases (CG).
- 10
- 15 Puede producirse biocombustible a partir de varias materias primas. Muchas de estas requieren el uso de diferentes cócteles enzimáticos. MGBG 16 es el mejor cóctel para la producción de materias primas a partir de los residuos de alimentos y verduras enumerados más adelante para producción de biogás por digestión anaerobia.

Tabla 18

Cóctel de Tratamiento	Restos de desperdicios usados	Principales azúcares liberados	% de Reducción de Carbonos por Digestión Anaerobia Mesófila	% de Reducción de Carbonos por Digestión Anaerobia Termófila	% de metano en biogás por Digestión Anaerobia Mesófila	% de metano en biogás por Digestión Anaerobia Termófila
MGBG 16	Algarroba	Xilosa, glucosa manosa, celobiosa	99-100	94,0-96,6	58,0	49,0
	Pan	Xilosa, xilobiosa, Glucosa, celobiosa	96,1-99,7	96,0-99,3	71,9	69,0
	Orujo de Manzana	Glucosa, Ácido galacturónico, Fructosa, Arabinosa, Galactosa, Xilosa	96,0-99,3	95,4-99,5	58,0	52,0
	Cartón	Xilosa, Glucosa (oligos traza mayores)	95,4-96,9	94,0-96,6	63,0	49,0
MGBG 18	Residuos mixtos de verduras/frutas (restaurante)	Xilosa, Glucosa, Ácido galacturónico, Fructosa; Arabinosa, Galactosa, Ramnosa				
(* el % de Metano en biogás es normalmente 50-65% máximo);						

Los datos de la Tabla 18 se consiguieron a tiempos de retención de solo 3 días, a diferencia de los informes de la bibliografía, en los que los tiempos de retención están normalmente entre 9 y 30 días. Los tiempos de retención indican el periodo que tarda (o periodo de latencia) el metabolismo de las materias primas de carbohidratos y la producción de biogás.

Ejemplo 12 Producción de bioetanol

Se realizó hidrólisis enzimática convencional a 37 °C, 50 °C y 60 °C en recipientes de 300 ml y 1 l con agitación a ~ 130 rpm. La dosificación enzimática fue de 32 UPF de cada preparación enzimática por gramo de celulosa en una solución de sustrato tamponada (como describe Gilleran, (NUI, Galway, Ph.D. Thesis, 2004) peso total procesado = a 100 g en estudios a escala de laboratorio). El pH del tampón de reacción se ajustó a pH 5,0. Las muestras se retiraron a intervalos cronometrados y la acción enzimática finalizó hirviendo durante 10 minutos. Durante un periodo de 0-72 horas se midió lo siguiente:

- Liberación de azúcares reductores y detección y cuantificación de azúcares individuales (expresado como g/l)
- Análisis por HPLC de los azúcares producto de hidrólisis (cantidades de producto expresadas en g/l)
- Reducción de peso/volumen del resto
- Contenido de fibras de celulosa antes y después del tratamiento enzimático

La microscopía electrónica de barrido (MEB) de la integridad del sustrato, antes y después de la producción, por tratamiento enzimático, de ácidos grasos clave durante el metabolismo de azúcares por las bacterias anaerobias, y la producción de metano, se supervisaron por cromatografía de gases (CG). Se midió el bioetanol producido por fermentación de levadura usando dos estrategias, un kit de ensayo ligado a enzimas, para la cuantificación de etanol (r-Biopharm, Alemania) y también por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Se ensayaron restos de hidrolizado de picea de sitka, residuos de papel y leñosos (mezcla de restos de coníferas, principalmente picea de sitka) en estudios a escala de laboratorio. Se investigaron dos formatos de producción de etanol, SHF (Hidrólisis y Fermentación Secuenciales, *Sequential Hydrolysis and Fermentation*) y SSF (Sacarificación y Fermentación Simultáneas, *Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

Tabla 19: Composición de cóctel enzimático para la producción de Bioetanol

Enzima	MGBG 1 ^a %	MGBG 2 ^b %	MGBG 3 ^c %	MGBG 4 ^d %
CBH I	20-28	15-20	15-17	12-15
CBH II	15-20	20-28	22-26	24-30
β-(1,3)4-glucanasa	20-25	20-26	25	20-22
β-glucosidasa	10-12	10-11	11-15	~10.0
Xilanasa	20-25	18-30	24-27	20-30
β-Xilosidasa,	5-10	8-10	10-12	5-8
α-Glucuronidasa	5-8	8-10	6-8	8-10
α-L-Arabinofuranosidasa (Otras hidrolasas,	0,5-2,0	0,5-2,0	2-4,0	1,5-3,0
incluyendo enzimas Pectinolíticas, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	8-15	6-17	12-15	10-15
Datos de estudios a escala de laboratorio de 1 l en SHF y SSF; los valores de hidrólisis se basan en la celulosa disponible y cualquier hemicelulosa residual en sustrato				

Tabla 20: Comparación de la producción de bioetanol de hidrolizado de píceas generado por composiciones de la invención y enzimas comerciales

Preparación enzimática	Tiempo de Reacción Óptimo (h)	% de Hidrólisis*	Hexosa g/l	Etanol SSF g/l (37°C)	Eficacia de Fermentación de SSF (37°C)	Temperatura de Reacción Óptima (°C) para SHF	Etanol de SHF g/l	Eficacia de Fermentación de SHF
Celluclast	48 h	74,5	13,59	4,69	43,44	50,0	6,93	64,21
Cell + Novozym (24:4)	48 h	78,9	19,46	nd	nd	50,0	8,97	83,18
	72 h	82,3	19,50	5,70	52,80	50,0	nd	nd
MGBG 1	48 h	57,9	12,56	4,83	44,74	50,0	nd	nd
	72 h	87,2	19,34	nd	nd	50,0	nd	nd
	24 h	88,1	19,14	nd	nd	60,0	10,29	91,50
	24 h	90,4	19,75	6,89	63,82	70,0	10,51	93,46
MGBG 2	24 h	89,3	20,84	7,04	65,25	60,0	10,39	92,39
	24 h	91,2	22,32	8,01	74,21	70,0	10,53	93,64
MGBG 3	24 h	87,3	15,69	8,58	79,53	70,0	8,71	80,71
MGBG 4	24 h	92,2	19,76	9,55	88,49	70,0	10,65	98,75
	48 h	89,9	16,14	nd	nd	70,0	nd	nd

Tabla 21: Producción de bioetanol de residuos de Papel y restos de Coníferas generado por los cócteles de enzimas termoestables de *T. emersonii* en comparación con "enzimas comerciales (datos de estudios a escala de laboratorio de 1 l en SHF y SSF; los valores de hidrólisis se basan en la celulosa disponible y cualquier hemicelulosa residual en el sustrato)

Preparación enzimática	Temperatura de Reacción Óptima (°C)	Tiempo de Reacción Óptimo (h)	% de Hidrólisis*	Hexosa g/l (37°C)	Etanol de SSF g/l (37°C)	Eficacia de Fermentación de SSF	Etanol de SHF g/l (37°C)	Eficacia de Fermentación de SHF (37°C)
Residuos de Papel								
MGBG 1	70,0	24 h	76,5	13,59	8,36	74,3	7,18	66,5
MGBG 3	70,0	24 h	79,2	17,57	7,89	70,2	8,08	74,6
MGBG 4	70,0	24 h	83,4	19,46	7,54	69,9	8,22	76,2
Residuos de Coníferas								
MGBG 1	70,0	24 h	63,8	11,21	7,57	67,3	7,03	65,1
MGBG 3	70,0	24 h	74,9	13,09	7,92	70,4	7,53	69,8
MGBG 4	70,0	24 h	77,9	13,57	7,74	71,8	7,82	72,5

Tabla 22: Otros cócteles para producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables a partir de flujos de residuos de verduras/frutas

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 18	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanasa (25-40%) β-glucosidasa (~5%) Xilanasa (18-25%) + [β-Xilosidasa 1-2,0%, Exoxilanasa 1-3,0%, α-Glucuronidasa 8-10%, α-L-Arabinofuranosidasa 1,5-5,0%; enzimas peptinolíticas 10-15%, incluyendo β-galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-7%; otras hemicelulasas al 5-10% incluyendo β-galactosidasa, oxidoreductasa/oxidasa y esterases 1-4% + proteasa 8-12%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materia primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, etc.	Residuos mixtos de verduras/frutas (restaurante)	>60°C (hasta 80°C)	Xilosa, Glucosa, ácido Galacturónico, Fructosa, Arabinosa, Galactosa, Ramnosa
MGBG 32	CBH I (1-5%) CBH II (1-5%) β(1,3)4-glucanasa (20-25%) β-glucosidasa (8-12%) Xilanasa (30-35%) + [β-Xilosidasa 0,5-1,5%, α-L-Arabinofuranosidasa 1-2,5%; enzimas peptinolíticas 18-25%, incluyendo β-galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón ~5-10%; oxidoreductasa/oxidasa y esterases 8-15% + proteasa 10-15%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materia primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, precursores de aroma y sabor, etc. También pueden usarse para extracción de zumo potenciada y producción de "bebidas sanas"	Residuos mixtos de verduras/frutas (restaurante) También frutas blandas mixtas	>60°C (hasta 80°C)	Xilosa, Glucosa, ácido Galacturónico, Fructosa, Arabinosa, Galactosa, Ramnosa

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 6 (4% CarrotBP; 1:1)	CBH I (1-5%) CBH II (1-5%) β(1,3)4-glucanasa (22-28%) β-glucosidasa (10-15%) Xilanasa (25-30%) + [β-Xilosidasa 0,7-2,1%, α-L-Arabinofuranosidasa 2-4%; enzimas peptinolíticas 20-25%, incluyendo β-galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón ~5-8%; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 12-15% + proteasa 8-12%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materia primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, precursores de aroma y sabor, etc. También pueden usarse para extracción de zumo potenciada y producción de "bebidas sanas"	Residuos mixtos de verduras/frutas (restaurante) También frutas blandas mixtas	>60°C (hasta 80°C)	Xilosa, Glucosa, ácido Galacturónico, Fructosa, Arabinosa, Galactosa, Ramnosa

Tabla 23: Cócteles para la producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables a partir de flujos de residuos de hospital ricos en celulosa

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 1	CBH I (20-28%) CBH II (15-20%) β(1,3)4-glucanasa (20-25%) β-glucosidasa (10-12%) Xilanasa (20-25%) β-Xilosidasa (5-10%) α-Glucuronidasa (5-8%) α-L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0%) (8-15%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinolíticas, ácido fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	65°C (hasta 85°C)	Xilosa, Glucosa, como los principales azúcares, con algo de galactosa

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 2	CBH I (15-20%) CBH II (20-28%) β(1,3)4-glucanasa (20-26%) β-glucosidasa (10-11%) Xilanasa (18-30%) β-Xilosidasa (8-10%) α-Glucuronidasa (8-10%) α-L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0%) (6-17%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, ácido fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C (hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa y galactosa
MGBG 4	CBH I (12-15%) CBH II (24-30%) β(1,3)4-glucanasa (20-22%) β-glucosidasa (~10%) Xilanasa (20-30%) β-Xilosidasa (5-8%) α-Glucuronidasa (8-10%) α-L-Arabinofuranosidasa (1,5-3,0%) (10-15%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, ácido fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C (hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa y galactosa
MGBG 27	CBH I (50-55%) CBH II (20-25%) β(1,3)4-glucanasa (12-20%) β-glucosidasa (5-8%) Xilanasa (~5%) β-Xilosidasa (0,1-0,5%) α-L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0%) (5-8%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas seleccionadas, esterasas; Proteasa 0,5-1,5%; actividades oxidasa 0,5-1,5%)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C (hasta 85°C)	Principalmente glucosa; cantidad menor de xilosa

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 31	CBH I (5-10%) CBH II (~15%) β(1,3)4-glucanasa (28-32%) β-glucosidasa (8-12%) Xilanasa (22-30%) β- Xilosidasa 10-15% α- Glucuronidasa (2-5%) α-L-Arabinofuranosidasa (1-3,0%) (20-25%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C(hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico
MGBG 34	CBH I (20-25%) CBH II (10-15%) β(1,3)4-glucanasa (24-28%) β-glucosidasa (10-15%) Xilanasa (25-30%) β- Xilosidasa (5-8%) α- Glucuronidasa (1-3%) α-L-Arabinofuranosidasa (2-3,0%) (5-10%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C(hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico
MGBG 35	CBH I (10-12%) CBH II (~15%) β(1,3)4-glucanasa (30-40%) β-glucosidasa (5-10%) Xilanasa (15-28%) β- Xilosidasa (2-5%) α- Glucuronidasa (1-3%) α-L-Arabinofuranosidasa (1-3,0%) (~15%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C(hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 36	CBH I (10-12%) CBH II (~15%) β(1,3)4-glucanasa (30-40%) β-glucosidasa (5-10%) Xilanasas (15-28%) β-Xilosidasas (2-5%) α-Glucuronidasas (1-3%) α-L-Arabinofuranosidasas (1-3,0%) (~15%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, tales como β-galactosidasas, ramnogalacturonasas, poligalacturonasas, exo-galacturonasas, enzimas degradantes de manano tales como α-galactosidasas; ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C(hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico
MGBG 37	CBH I (15-20%) CBH II (35-40%) β(1,3)4-glucanasa (20-25%) β-glucosidasa (5-10%) Xilanasas (15-20%) β-Xilosidasas (1-3%) α-Glucuronidasas (0,5-2%) α-L-Arabinofuranosidasas (1-3,0%) (12-15%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, tales como β-galactosidasas, ramnogalacturonasas, poligalacturonasas, exo-galacturonasas, enzimas degradantes de manano tales como α-galactosidasas; ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C(hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 38	CBH I (25-30%) CBH II (15-20%) β (1,3)4-glucanasa (15-20%) β -glucosidasa (2-8%) Xilanasa (25-30%) β -Xilosidasa (1-3%) α -Glucuronidasa (0,5-2%) α -L-Arabinofuranosidasa (1-3,0%) (15-20%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, tales como β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exo-galacturonasa, enzimas degradantes de manano tales como α -galactosidasa; ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, compuestos de aroma y saporíferos de alimentos, materias primas químicas etc.	Textiles ricos en algodón, especialmente en formas de algodón muy purificadas	60°C(hasta 85°C)	Glucosa, algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico. Cantidades menores de xilosa
MGBG 39	CBH I (20-25%) CBH II (20-25%) β (1,3)4-glucanasa (20-25%) β -glucosidasa (8-12%) Xilanasa (20-25%) β -Xilosidasa (2-5%) α -Glucuronidasa (1-3%) α -L-Arabinofuranosidasa (1-3,0%) (8-12%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinólíticas, tales como β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exo-galacturonasa, enzimas degradantes de manano tales como α -galactosidasa; ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, compuestos de aroma y saporíferos de alimentos, materias primas químicas etc.	Textiles ricos en algodón, incluyendo más fibras mixtas	60°C(hasta 85°C)	Principalmente glucosa, con algo de xilosa y manosa

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcar de los productos
MGBG 40	CBH I (18-25%) CBH II (15-20%) β(1,3)4-glucanasa (25-30%) β-glucosidasa (5-10%) Xilanasa (20-25%) β-Xilosidasa (0,5-2%) α-Glucuronidasa (0,5-2%) α-L-Arabinofuranosidasa (1,5-4,0%) (20-25%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinolíticas, tales como β-galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exo-galacturonasa, enzimas degradantes de manano tales como α-galactosidasa; ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C(hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa y galactosa
MGBG 43	CBH I (10-15%) CBH II (20-25%) β(1,3)4-glucanasa (25-30%) β-glucosidasa (5-10%) Xilanasa (25-30%) β-Xilosidasa (5-10%) α-Glucuronidasa (1-3%) α-L-Arabinofuranosidasa (1-3,0%) (10-14%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas Peptinolíticas, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible	Flujo de residuos de hospital ricos en celulosa esterilizados	60°C(hasta 85°C)	Glucosa y xilosa, como los principales azúcares, con algo de manosa

Tabla 24: Cócteles para la producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables de flujos de residuos textiles.

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 34	CBH I (20-25 %) CBH II (10-15%) β (1,3)4-glucanasa (24-28 %) β -glucosidasa (10-15 %) Xilanasa (25-30 %) β -Xilosidasa (5-8 %) α -Glucuronidasa (1-3 %) α -L-Arabinofuranosidasa (2-3,0 %) (5-10 %: otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico y acetil(xilan) esterasas, proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa o modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, compuestos aromatizantes y saporíferos de alimentos, materias primas químicas, etc.	Textiles ricos en algodón	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa principalmente con algo de xilosa, galactosa y ácido galacturónico.
MGBG 37	CBH I (15-20 %) CBH II (35-40 %) β (1,3)4-glucanasa (20-25 %) β -glucosidasa (5-10 %) Xilanasa (15-20 %) β -Xilosidasa (1-3 %) α -Glucuronidasa (0,5-2 %) α -L-Arabinofuranosidasa (0,1-3,0 %) (12-15 %: Otras hidrolasas, incluyendo enzimas Pectinolíticas tales como , β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exo-galacturonasa, enzimas degradantes de manano tales como α -galactosidasa, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, compuestos aromatizantes y saporíferos de alimentos, materias primas químicas, etc.	Textiles ricos en algodón, incluyendo más fibras mixtas y más textiles de algodón procesados.	65 °C (hasta 85 °C)	Principalmente glucosa, algunas cantidades menores de xilosa y manosa.

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 38	CBH I (25-30 %) CBH II (15-20 %) β (1,3)4-glucanasa (15-20 %) β -glucosidasa (2-8 %) Xilanasa (25-30 %) β -Xilosidasa (1-3 %) α -Glucuronidasa (0,5-2 %) α -L-Arabinofuranosidasa (1-3,0 %) (15-20 %: Otras hidrolasas, incluyendo enzimas Pectinolíticas tales como , β -galctosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exo-galacturonasa, enzimas degradantes de manano tales como α -galactosidasa, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, compuestos aromatizantes y saporíferos de alimentos, materias primas químicas, etc.	Textiles ricos en algodón, especialmente en formas de algodón muy purificadas	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa, algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico. Cantidades menores de xilosa.
MGBG 39	CBH I (20-25 %) CBH II (20-25 %) β (1,3)4-glucanasa (20-25 %) β -glucosidasa (8-12 %) Xilanasa (20-25 %) β -Xilosidasa (2-5 %) α -Glucuronidasa (1-3 %) α -L-Arabinofuranosidasa (1-3,0 %) (8-12 %: Otras hidrolasas, incluyendo enzimas Pectinolíticas tales como , β -galctosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa, enzimas degradantes de manano tales como α -galactosidasa, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, compuestos aromatizantes y saporíferos de alimentos, materias primas químicas, etc.	Textiles ricos en algodón, incluyendo más fibras mixtas.	65 °C (hasta 85 °C)	Principalmente glucosa, con algo de xilosa y manosa.

Tabla 25: Cócteles para la producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables de cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza.

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 5	CBH I (5-10 %) CBH II (8-15 %) $\beta(1,3)4$ -glucanasa (18-22 %) β -glucosidasa (6-10 %) Xilanasa (30-35 %) + [β -Xilosidasa 5-12 % Exoxylanasa 10-15 %; α -Glucuronidasa (3-5 %), α -L-Arabinofuranosidasa (1,5-5,0 %); enzimas Pectinolíticas 8-10 %, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-7 %; otras hemicelulasas incluyendo α -galactosidasa 4-7 %, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 1-4 %, + proteasa 2-6 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza, especialmente residuos de cebada, trigo, centeno, maíz, malta/masa (incluyendo granos de destilación).	>60 °C. (hasta 80 °C)	Xilosa, arabinosa, glucosa, celobiosa, xelobiosa, galactosa, ácido glucurónico, algunos ácidos fenólicos, cantidades pequeñas de ácidos glucurónicos, ácido galacturónico y Ramnosa y oligosacáridos superiores.
MGBG 6	CBH I (1-5 %) CBH II (1-5 %) $\beta(1,3)4$ -glucanasa (22-28 %) β -glucosidasa (10-15 %) Xilanasa (25-30 %) +[β -Xilosidasa 0,7-2,1 %, α -L-Arabinofuranosidasa 2-4%;enzimas Pectinolíticas 20-25 %, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón ~ 5-8 %; oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 12-15 %, + proteasa 8-12 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, precursores de aromatizantes y saporíferos, edulcorantes naturales, etc.	Cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza especialmente cebada, trigo y avena.	>60 °C. (hasta 85 °C)	Xilosa, arabinosa, principalmente glucosa, cantidades pequeñas de ácidos glucurónicos, galactosa, ácido galacturónico y Ramnosa y disacáridos (celobiosa y xilobiosa).

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 7	CBH I (5-10 %) CBH II (8-12 %) β (1,3)4-glucanasa (25-30 %) β -glucosidasa (5-10 %) Xilanasa (40-45 %) + [β -Xilosidasa 0,5-2,0 %, α -glucuronidasa, α -L-Arabinofuranosidasa 0,5-2,0 %; enzimas Pectinolíticas 8-15 %, principalmente β -galactosidasa y exogalacturonasa, esterases 2-4 %, + proteasa 10-15 %]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo, productos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Restos de cebada, mijo, trigo, avena.	>60 °C. (hasta 85 °C)	Principalmente xilosa, arabinosa, glucosa, celobiosa, xilobiosa, ácido glucurónico, algo de galactosa, ácidos fenólicos, ácido galacturónico.
MGBG 8	CBH I (5-10 %) CBH II (5-10 %) β (1,3)4-glucanasa (~20 %) β -glucosidasa (4-8 %) Xilanasa (25-30 %), incluyendo Exoxylanasa (5-10 %) + [β -Xilosidasa 1-2,0 %, α -Glucuronidasa 5-8 %, α -L-Arabinofuranosidasa 0,5-3,0 %; enzimas Pectinolíticas 8-12 %, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 8-12 %; otras hemicelulasas 5-10 %, incluyendo α -galactosidasa, oxidoreductasa/oxidasa y esterases 1-3 %, + proteasa 10-12 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza, especialmente residuos de trigo, avena, cebada, malta/masa (incluyendo granos de destilación).	>60 °C. (hasta 80 °C)	Xilosa, arabinosa, glucosa, celobiosa, xilobiosa; cantidades menores de ácido glucurónico, ácidos fenólicos y galactosa.

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 9	CBH I (5-10 %) CBH II (5-10 %) β (1,3)4-glucanasa (20-25 %, incluyendo liquenanas superior) β -glucosidasa (8-10 %) Xilanasa (25-30 %), incluyendo Exoxylanasa a ~ 8-12 %)+ [β -xilosidasa 2-5,0 %, α -Glucuronidasa 1-4 %, α -L-Arabinofuranosidasa (2-5,0 %); enzimas Pectinolíticas 5-10 %, incluyendo α -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-10 %; otras hemicelulasas 3-6 %, incluyendo β -galactosidasa, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 2-4 %, + proteasa 5-10 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza, especialmente residuos de trigo, avena, cebada, sorgo y más residuos adyuvantes nuevos, residuos de malta/masa (incluyendo granos de destilación).	>60 °C. (hasta 80 °C)	Xilosa, arabinosa, glucosa, celobiosa, xilobiosa; cantidades menores de ácido glucurónico, ácidos fenólicos y galactosa.
MGBG 10	CBH I (3-6 %) CBH II (5-10 %) β (1,3)4-glucanasa (25-40 %, incluyendo liquenanas superior) β -glucosidasa (2-5 %) Xilanasa ~ (25-30 %), incluyendo Exoxylanasa a ~ 10-15 %)+ [β -xilosidasa 5-12 %, α -Glucuronidasa 2-5 %, α -L-Arabinofuranosidasa (2-5,0 %); enzimas Pectinolíticas ~ 5-8 %, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 2-5 %; otras hemicelulasas 2-5 %, incluyendo β -galactosidasa, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 1-3 %, + proteasa 3-6 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza, especialmente residuos de trigo, avena, cebada, maíz, centeno, malta/masa (incluyendo granos de destilación).	>60 °C. (hasta 80 °C)	Xilosa, arabinosa, glucosa, celobiosa, xilobiosa; cantidades menores de ácido glucurónico, ácidos fenólicos y galactosa. Algunos oligosacáridos superiores.

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 11	CBH I (1-5 %) CBH II (5-8 %) β (1,3)4-glucanasa (20-25 %, incluyendo alta actividad frente a glucanos de enlace mixto DP superiores y medios) β -glucosidasa (20-30 %) Xilanasa (~ 15-20 %), incluyendo Exoxilanasa ~ 3-6 %) + β -xilosidasa 2-6 %, α -Glucuronidasa 1-3 %, α -L-Arabinofuranosidasa 1,5-3,0 %; enzimas Pectinolíticas ~8-12 %, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-10 %; otras hemicelulasas 6-11 %, incluyendo α -galactosidasa, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 3-7 %, + proteasa 10-15 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza, especialmente restos de trigo, maíz, avena, cebada, malta/masa de centeno (incluyendo granos de destilación).	>60 °C. (hasta 80 °C)	Xilosa, arabinosa, glucosa, cantidades menores de ácido glucurónico, ácidos fenólicos galactosa y Ramnosa. Algunos oligosacáridos superiores.
MGBG 13	CBH I (5-10 %) CBH II (5-10 %) β (1,3)4-glucanasa (25-40 %) β -glucosidasa (~5 %) Xilanasa (18-25 %), + [β -xilosidasa 1-2,0 %, exoxilanasa 1-3,0 %, α -Glucuronidasa 8-10 %, α -L-Arabinofuranosidasa 1,5-5,0 %; enzimas Pectinolíticas 10-15 %, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-7 %; otras hemicelulasas 5-10 %, incluyendo α -galactosidasa, oxidoreductasa/oxidasa y esterasas 1-4 %, + proteasa 8-12 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Cereales, incluyendo cultivos completos, granos, restos de procesamiento y residuos de fabricación de cerveza, especialmente de avena, cebada, trigo, malta/masa (incluyendo granos de destilación).	>60 °C (hasta 80 °C)	Xilosa, arabinosa, glucosa, celobiosa, galactosa, ácido glucurónico, algunos ácidos fenólicos, ácido Galacturónico y Ramnosa.

Tabla 26: Cócteles para la producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables a partir de residuos hortícolas basados en no-cereales, incluyendo hierbas (y ensilaje), hojas, recortes de poda y flujos de residuos de floristería.

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 2	CBH I (15-20 %) CBH II (20-28 %) β (1,3)4-glucanasa (20-26 %) β -glucosidasa (10-11 %) Xilanasa (18-30%) β -xilosidasa (8-10 %) α -Glucuronidasa (8-10 %), α -L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0 %) (6-17%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico y acetil (xilan)esterasas, proteasa; actividades oxidasa modificadoras de Lignina).	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo, compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, moléculas antioxidantes, etc.	Residuos hortícolas, incluyendo hierbas, hojas, recortes de poda y flujos de residuos de floristería mixtos; especialmente buenos para más materiales leñosos.	60 °C. (hasta 85 °C)	Glucosa y xilosa como los principales azúcares, con algo de arabinosa, manosa y galactosa, ácidos glucurónico y galacturónico, algunos ácidos fenólicos y ramnosa, así como algunos oligosacáridos DP superiores.
MGBG 13	CBH I (5-10 %) CBH II (5-10 %) β (1,3)4-glucanasa (25-40 %) β -glucosidasa (~5 %) Xilanasa (18-25%), + [β -xilosidasa 1-2,0%, 1-3,0; exoxilanasa 8-10, α -Glucuronidasa 1,5-5,0 %), α -L-Arabinofuranosidasa; 10-15%; enzimas pectinolíticas incluyendo α galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactosaza, actividad modificadora de almidón 5-7 %; otras hemicelulasas 5-10 %, incluyendo α -galactosidasa, 1-4 %, óxido reductasa/oxidasa y estearasas + proteasa 8-12 %]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo, compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, moléculas antioxidantes, etc.	Residuos hortícolas, incluyendo hierbas, hojas, recortes de poda y flujos de residuos de floristería mixtos; especialmente buenos hierbas y ensilaje.	>60 °C. (hasta 80 °C)	Xilosa, arabinosa, glucosa, celobiosa, xilobiosa, galactosa, manosa, ácido glucurónico, algunos ácidos fenólicos, ácido galacturónico y Ramnosa. Algunos oligosacáridos superiores.

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (° C)	Azúcares de los productos
MGBG 21	CBH I (5-10 %) CBH II (5-10 %) β (1,3)4-glucanasa (15 %) β -glucosidasa (~2-10 %) Xilanasa (50-55 %), + [xilosidasa 1-5%]; exoxilanasa 5-10 %, α -Glucuronidasa (1-4 %), α -L-Arabinofuranosidasa (2-5%);enzimas pectinolíticas 20-25 %, actividad modificadora de almidón 4-6 %; otras hemicelulasas 7-10 %, oxidoreductasa/oxidasa y estearasas 2-4 % + proteasa ~10 %].	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo, compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, precursores de aroma y sabor, moléculas antioxidantes, etc.	Residuos hortícolas, incluyendo hierbas, hojas, recortes de poda y flujos de residuos de floristería mixtos; también buenos para corteza.	>60 °C. (hasta 80/85 °C)	Xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa, manosa, ácido galacturónico, algo de fructosa, Ramnosa; algunos ácidos fenólicos y sacarosa; algunos oligosacáridos superiores.
MGBG 32	CBH I (1-5 %) CBH II (1-5 %) β (1,3)4-glucanasa (20-25 %) β -glucosidasa (8-12 %) Xilanasa (30-35 %) + [β -xilosidasa (0,5-1,5%), α -L-Arabinofuranosidasa (1-2,5%); enzimas pectinolíticas 18-25 %, incluyendo α -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón ~5-10 %; óxido reductasa/oxidasa y estearasas 8-15 % + proteasa 10-15 %].	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustible y/u otros productos de alto valor, por ejemplo, compuestos (bio) químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, moléculas antioxidantes, etc.	Residuos hortícolas, incluyendo hierbas, hojas, recortes de poda y flujos de residuos de floristería mixtos.	>60 °C. (hasta 80 °C)	Xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa, ácido galacturónico, algo de fructosa, Ramnosa; algunos ácidos fenólicos.
MGBG 34 CBH	CBH I (20-25 %) CBH II (10-15 %) β (1,3)4-glucanasa (24-28 %) β -glucosidasa (10-15 %) Xilanasa (25-30 %), + β -xilosidasa (5-8 %), α -Glucuronidasa (1-3 %), α -L-Arabinofuranosidasa (2-3,0 %) (5-10%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas, ácido fenólico y acetil (xilan)esterasas, proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina).	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, compuestos aromáticos y saporíferos de los alimentos, materias primas químicas, etc.	Residuos hortícolas, incluyendo hierbas, hojas, recortes de poda y flujos de residuos de floristería mixtos.	60 °C. (hasta 85 °C)	Glucosa, arabinosa y xilosa principalmente con algo de galactosa y ácido galacturónico; ácidos fenólicos, Ramnosa y algún oligosacárido.

Tabla 27: Cócteles para producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables a partir de flujos de residuos de papel

Los residuos de papel incluyen: papel de periódico en blanco y negro, papel de periódico en color, revistas satinadas, vasos de papel, platos de papel, pañuelos de papel/toallitas, papel marrón, cartón corrugado, papel de oficina blanco, celofán, papel de cocina, Kleenex™ y vendas de algodón domésticas					
Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 26	CBH I (5-10%) CBH II (45-50%) β (1,3)4-glucanasa (10-15%) β -glucosidasa (0,5-2,0%) Xilanasa (15-20%) β -Xilosidasa (0,2-1,0%) α -Glucuronidasa (0,5-2,0%) α -L-Arabinofuranosidasa (0,5-1,5%) Otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas 3-6%, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas 0,2-1,0, Proteasa 1-5%; enzimas modificadoras de almidón 5-10%, actividades oxidorreductasa/oxidasa 2-5	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, saporíferos de alimentos y compuestos aromáticos, materias primas químicas, etc.	Vasos de papel, papel marrón, Kleenex™ y productos residuales de papel relacionados	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa, arabinosa y xilosa, algo de galactosa y ácido galacturónico; algunos oligosacáridos
MGBG 27	CBH I (50-55%) CBH II (20-25%) β (1,3)4-glucanasa (12-20%) β -glucosidasa (5-8%) Xilanasa (~5%) β -Xilosidasa (0,1-0,5%) α -L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0%) (5-8%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas seleccionadas, esterasas; Proteasa 0,5-1,5%; actividades oxidasa 0,5-1,5%)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, saporíferos de alimentos y compuestos aromáticos, materias primas químicas, etc.	Papel blanco de oficina, platos de papel y productos relacionados	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa, cantidades menores de arabinosa y xilosa, galactosa y ácido galacturónico; algunos oligosacáridos, pero principalmente monosacáridos
MGBG 28	CBH I (10-15%) CBH II (30-35%) β (1,3)4-glucanasa (15-20%) β -glucosidasa (2-5%) Xilanasa (20-25%) β -Xilosidasa (0,5-2,0%) α -L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0%) (17-26%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas y modificadoras de almidón seleccionadas, esterasas 2-5%; Proteasa 8-10%; actividades oxidasa 2-5%)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, saporíferos de alimentos y compuestos aromáticos, materias primas químicas, etc.	Papel blanco de oficina, platos de papel y productos relacionados	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa, cantidades menores de arabinosa y xilosa, galactosa y ácido galacturónico; algunos oligosacáridos, pero principalmente monosacáridos

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 29	CBH I (8-10%) CBH II (8-10%) β (1,3)4-glucanasa (20-30%) β -glucosidasa (25-30%) Xilanasa (20-30%) β -Xilosidasa (0,5-2,0%) β -L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0%) Hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas 5-10% y modificadoras de almidón 5-8%, esterasas 1-3%; Proteasa 5-10%; oxidasas 2-5%	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, saporíferos de alimentos y compuestos aromáticos, materias primas químicas, etc.	Toallitas, vendas de algodón, cartón y celofán	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa, cantidades menores de arabinosa y xilosa, galactosa y ácido galacturónico; algunos oligosacáridos, pero principalmente monosacáridos

Tabla 28: Cócteles para producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables a partir de residuos/restos de envasado biodegradables

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 30	CBH I (20-25%) CBH II (20-25%) β (1,3)4-glucanasa (15-20%) β -glucosidasa (1-5%) Xilanasa (25-30%) β -Xilosidasa (5-10%) α -L-Arabinofuranosidasa (0,6-2,0%) (otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas 8-12% seleccionadas, enzimas modificadoras de almidón 4-8%, enzimas degradantes de manano 1-3%, esterasas 1-5%; Proteasa 3-6,0%; actividades oxidasa 2-5%)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, saporíferos de alimentos y compuestos aromáticos, materias primas químicas, etc.	Residuos/restos de envasado biodegradables	60 °C (hasta 85 °C)	Xilosa, glucosa, galactosa, cantidades pequeñas de manosa, ácido galacturónico; y algunos oligosacáridos, pero principalmente monosacáridos

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 35	CBH I (10-12%) CBH II (~15%) β (1,3)4-glucanasa (30-40%) β -glucosidasa (5-10%) Xilanasa (15-28%) β -Xilosidasa (2-5%) α -Glucuronidasa (1-3%) α -L-Arabinofuranosidasa (1-3,0%) (~15%: otras hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas tales como α -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exo-galacturonasa, enzimas degradantes de manano tales como β -galactosidasa, ácido Fenólico y acetil(xilan) esterasas, Proteasa; enzimas modificadoras de almidón, actividades oxidasa modificadoras de Lignina)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, saporíferos de alimentos y compuestos aromáticos, materias primas químicas, etc.	Residuos/restos de envasado biodegradables	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa y xilosa como los principales azúcares, con algo de manosa, galactosa y ácido galacturónico
MGBG 29	CBH I (8-10%) CBH II (8-10%) β (1,3)4-glucanasa (20-30%) β -glucosidasa (25-30%) Xilanasa (20-30%) β -Xilosidasa (0,5-2,0%) α -L-Arabinofuranosidasa (0,5-2,0%) (Hidrolasas, incluyendo enzimas pectinolíticas 5-10% seleccionadas y modificadores de almidón 5-8%, esterasas 1-3%; Proteasa 5-10%; actividades oxidasa 2-5%)	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y otros productos de alto valor, incluyendo antibióticos, carotenoides, saporíferos de alimentos y compuestos aromáticos, materias primas químicas, etc.	Residuos/restos de envasado biodegradables	60 °C (hasta 85 °C)	Glucosa, cantidades menores de arabinosa y xilosa, galactosa y ácido galacturónico; principalmente monosacáridos

Tabla 29: Cócteles para producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables a partir de biomasa fúngica (incluyendo biomasa gastada después de la fermentación) y biomasa de algas marinas

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 9	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (20-25%, incluyendo liquenanas superior) β -glucosidasa (8-10%) Xilanasa (25-30%, incluyendo Exoxilanasa ~8-12%) + [β -Xilosidasa 2-5,0% α -Glucuronidasa 1-4%, α -L-Arabinofuranosidasa 2-5,0%; enzimas pectinolíticas 5-10%, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-10%; otras hemicelulasas 3-6%, incluyendo α -galactosidasa, oxidorreductasa/oxidasa y esterasas 2-4% + proteasa 5-10%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente
MGBG 13	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (25-40%) β -glucosidasa (~5%) Xilanasa (18-25%) + [β -Xilosidasa 1-2,0%, Exoxilanasa 1-3,0%, α -Glucuronidasa 8-10%, α -L-Arabinofuranosidasa 1,5-5,0%; enzimas pectinolíticas 10-15%, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-7%; otras hemicelulasas 5-10%, incluyendo α -galactosidasa, oxidorreductasa/oxidasa y esterasas 1-4% + proteasa 8-12%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 44	CBH I (2-5%) CBH II (2-5%) β (1,3)4-glucanasa (20-25%) (1,3)6-glucanasa (20-25%) N-Acetilglucosaminidasa y/o quitinasa 2-5% β -glucosidasa (5-10%) Xilanasa (10-15%) + [β -Xilosidasa 5-10%, α -Glucuronidasa 1-5%, α -L-Arabinofuranosidasa 1-5,0%; enzimas pectinolíticas 2-5%, incluyendo α -galactosidasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 2-5%; otras hemicelulasas 3-5%, incluyendo mananasa, oxidorreductasa/oxidasa 2-5% y esterases 2-4% + proteasa 25-30%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente
MGBG 45	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (15-20%) (1,3)6-glucanasa (25-30%) N-Acetilglucosaminidasa y/o quitinasa 5-10% β -glucosidasa (5-10%) Xilanasa (1-4%) + [β -Xilosidasa 2-5%, enzimas pectinolíticas 5-10%, incluyendo β -galactosidasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 12-15%; otras hemicelulasas 2-5%, incluyendo mananasa, oxidorreductasa/oxidasa 2-5% y esterases 2-4% + proteasa 10-15%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos <u>o</u> Biomasa de algas y restos de procesamiento	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 46	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (25-30%) β -glucosidasa (5-10%) Xilanasa (20-25%) + [β -Xilosidasa 2-5%, α -Glucuronidasa 1-4%, α -L-Arabinofuranosidasa 2-5%; enzimas pectinolíticas 5-8%, incluyendo β -galactosidasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-10%; otras hemicelulasas 1-2%, incluyendo mananasa, oxidorreductasa/oxidasa 2-5% y esterases 2-5% + proteasa 30-35%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente
MGBG 47	CBH I (2-5%) CBH II (2-5%) β (1,3)4-glucanasa (10-15%) (1,3)6-glucanasa (40-45%) β -glucosidasa (8-10%) Xilanasa (2-5%) + [β -Xilosidasa 1-3%, α -glucuronidasa 1-2%, α -L-Arabinofuranosidasa 2-5%; enzimas pectinolíticas 2-5%, incluyendo β -galactosidasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 2-5%; otras hemicelulasas ~5%, incluyendo mananasa, oxidorreductasa/oxidasa 2-5% y esterases 1-3%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 48	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanasa (40-45%) (1,3)6-glucanasa (10-15%) β-glucosidasa (8-12%) Xilanasas (10-15%) + [β-Xilosidasa 5-8%, α-glucuronidasa 0,5-1,5%, α-L-Arabinofuranosidasa 0,5-1,5%; enzimas pectinolíticas 2-5%, incluyendo β-galactosidasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 2-5%; otras hemicelulasas ~5%, incluyendo mananasa, oxidoreductasa/oxidasa 1-3% y esterases 1-3%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente
MGBG 49	CBH I (0,4-2%) CBH II (0,4-1,0%) β(1,3)4-glucanasa (7,0-15,0%) (1,3)6-glucanasa (12-15%) β-glucosidasa (3,0-5,0%) Xilanasas (75,0-78,0%) + [β-Xilosidasa 0,4-2,0%, α-glucuronidasa 0,5-1,5%, α-L-Arabinofuranosidasa 0,2-1,5%; enzimas pectinolíticas 2-5%, incluyendo β-galactosidasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 2-5%; otras hemicelulasas ~4,0-7,0%, incluyendo mananasa, oxidoreductasa/oxidasa 1-3% y esterases 1-3%]	Producción de azúcares fermentables para fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, edulcorantes naturales, etc.	Biomasa de levadura y hongos filamentosos	>60 °C (hasta 80 °C)	Glucosa, celobiosa, manosa, Galactosa y algunos oligosacáridos, principalmente

Tabla 30: Cócteles para producción de hidrolizados ricos en azúcares fermentables a partir de pulpa de remolacha azucarera, caña de azúcar y restos de las mismas

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 6	CBH I (1-5%) CBH II (1-5%) β(1,3)4-glucanasa (22-28%) β-glucosidasa (10-15%) Xilanasa (25-30%) + [β-Xilosidasa 0,7-2,1%, α-L-Arabinofuranosidasa 2-4%; enzimas pectinolíticas 20-25%, incluyendo β-galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón ~5-8%; oxidorreductasa/oxidasa y esterasas 12-15% + proteasa 8-12%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, precursores de aroma y sabor, etc.	Remolacha azucarera, incluyendo las partes superiores, pulpa de remolacha y planta completa, así como caña de azúcar y residuos de procesamiento	>60 °C (hasta 85 °C)	Xilosa, Glucosa, ácido Galacturónico, Fructosa, Arabinosa, Galactosa, Ramnosa, Algunos oligosacáridos; ácido fenólico liberado
MGBG 20	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β(1,3)4-glucanasa (20-32%) β-glucosidasa (~2-10%) Xilanasa (15-25%) + [β-Xilosidasa 15-20,0% Exoxilanasa 10-15%, α-Glucuronidasa 2-5%, α-L-Arabinofuranosidasa 1,5-5%; enzimas pectinolíticas 10-15%, actividad modificadora de almidón ~10%; otras hemicelulasas ~5%, oxidorreductasa/oxidasa y esterasas 2-5% + proteasa ~7-10%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, etc.	Remolacha azucarera, incluyendo las partes superiores, pulpa de remolacha y planta completa, así como caña de azúcar y residuos de procesamiento	>60 °C (hasta 80/85 °C)	Xilosa, Glucosa, ácido Galacturónico, Fructosa, Sacarosa, Arabinosa, Galactosa, Ramnosa, Algunos oligosacáridos; ácido fenólico liberado

(continuación)

Cóctel	Composición del cóctel (%)	Aplicación diana	Sustrato	Temperatura de tratamiento óptima (°C)	Azúcares de los productos
MGBG 18	CBH I (5-10%) CBH II (5-10%) β (1,3)4-glucanasa (25-40%) β -glucosidasa (~5%) Xilanasa (18-25%) + [β -Xilosidasa 1-2,0%, Exoxilanasa 1-3,0%, α -Glucuronidasa 8-10%, α -L-Arabinofuranosidasa 1,5-5,0%; enzimas pectinolíticas 10-15%, incluyendo β -galactosidasa, ramnogalacturonasa, poligalacturonasa, exogalacturonasa y galactanasa, actividad modificadora de almidón 5-7%; otras hemicelulasas 5-10%, incluyendo α -galactosidasa, oxidorreductasa/oxidasa y esterasas 1-4% + proteasa 8-12%]	Producción de azúcares fermentables para la fabricación de biocombustibles y/u otros productos de alto valor, por ejemplo compuestos (bio)químicos/materias primas químicas, carotenoides, antibióticos, probióticos, etc.	Remolacha azucarera, incluyendo las partes superiores, pulpa de remolacha y planta completa, así como caña de azúcar y residuos de procesamiento	>60 °C (hasta 80 °C)	Xilosa, Glucosa, ácido Galacturónico, Fructosa, Sacarosa, Arabinosa, Galactosa, Ramnosa Algunos oligosacáridos; ácido fenólico liberado

Varios de los cócteles enumerados anteriormente tienen aplicaciones en una amplia serie de otras aplicaciones. En estas aplicaciones, las diferencias clave en el uso de los cócteles corresponden a (a) dosificación de enzimas, o cantidad usada en cada tratamiento, y (b) la duración de la incubación. Por ejemplo, MGBG 18 está muy bien adaptada para el tratamiento de ciertos flujos de residuos, así como en las aplicaciones de nutracéuticos. En las etapas de sacarificación/tratamiento de "residuos", se usa una mayor dosificación de enzima y el tiempo de reacción es de ~18-24 horas (~25-32 unidades de papel de filtro). El objetivo último es conseguir la degradación exhaustiva del resto diana en monosacáridos fermentables. Por el contrario, cuando se requiere producción de oligosacáridos bioactivos (glucooligosacáridos y xilooligosacáridos), y/o un cambio de textura para panes, se requiere una concentración enzimática menor y el tiempo de modificación (o reacción) puede no tardar más de 1 (máximo 2) horas en conseguir el punto final deseado.

Cuando el sustrato diana es principalmente rico en celulosa, las concentraciones de enzima se han basado en "unidades de papel de filtro o UPF". Cuando se produce un oligosacárido bioactivo (por ejemplo β -glucooligosacárido no celulósico), las concentraciones de enzima se basan en la actividad principal requerida para fermentar el sustrato diana (por ejemplo β -1,3;1,4-glucanos o β -1,3;1,6-glucanos no celulósicos, de enlace mixto de fuentes fúngicas o de algas).

Ejemplo 13 Producción de enzimas por cepas de *T. emersonii* durante la fermentación líquida

Se examinaron las cepas de *Talaromyces emersonii*:

IMI (Imperial Mycological Institute (CABI Bioscience))393751 (cepa de Patente), IMI 393753 (CBS(Centraal Bureau voor Schimmelcultures) 180.68), IMI 393755 (CBS 355.92), IMI 393756 (CBS 393.64), IMI 393757 (CBS 394.64), IMI 393758 (CBS 395.64), IMI 393759 (CBS 397.64), IMI 393760 (CBS 472.92), IMI 393752 (CBS 549.92), IMI 393761 (CBS 759.71).

Fermentación líquida; se dejaron crecer cultivos líquidos repetidos de la *T. emersonii* individual a 45 °C, en el medio descrito por Moloney y col., (1983) y Tuohy y Coughlan (1992), en condiciones con pH no controlado. Las cuatro fuentes de carbono seleccionadas fueron: glucosa (monosacárido), xilano de cascarillas de avena (arabinoglucuronoxilano), polvo de algarroba y una mezcla de hojas de té/platos de papel 1:1 (fragmentada en una mezcladora durante ~15-20 segundos, se recuperaron los sobrenadantes de cultivo (Tuohy y Coughlan, 1992; Murray y col., 2002) y se usaron para analizar la producción enzimática extracelular. Ensayos de enzima; la actividad

enzimática se expresó en Unidades Enzimáticas Internacionales (UI) por gramo de fuente de carbono inductora. Una unidad UI libera 1 micromol de producto (azúcar reductor, 4-nitrofenol, etc.) por minuto. Todos los ensayos de enzima exoglicosidasa y endo-hidrolasa se realizaron como se ha descrito previamente (Tuohy y Coughlan, 1992; Tuohy y col., 1994, 2002; Murray y col., 2002; Gilleran, 2004). A no ser que se indique de otro modo, todas las mediciones de actividad iniciales se realizaron a 50 °C y pH 5,0. Las actividades exoglicosidasa incluyeron: β -Glucosidasa, α -Glucosidasa, β -Xilosidasa, β -Galactosidasa, β -Manosidasa, β -Fucosidasa, α -Arabinofuranosidasa, N-Acetilglucosaminidasa, α -Ramnopiranosidasa, α -Galactosidasa, α -Fucosidasa, α -Arabinopiranosidasa, α -Manosidasa y α -Xilosidasa. La actividad α -Glucuronidasa se ensayó mediante un procedimiento de azúcares reductores usando una mezcla de ácidos aldourónicos reducidos como sustrato (Megazyme International Ltd). Este sustrato contenía ácidos aldotriourónicos, aldotetraurónicos y aldopentaurónicos reducidos en una relación de aproximadamente 40:40:20. La actividad se midió a pH 5,0 con una reserva de 5 mg/ml de esta mezcla. Los grupos reductores liberados durante un periodo de incubación de 30 minutos se detectaron mediante el procedimiento de DNS. Puesto que algunas de las muestras de enzimas contenían actividad β -xilosidasa apreciable que podría liberar restos de xilosa de los ácidos aldourónicos, el ensayo se repitió y la xilosa se incluyó en la mezcla de reacción para inhibir la actividad β -xilosidasa.

También se midieron enzimas xilanolíticas de acción externa adicionales tales como: α -arabinoxilan arabinofuranohidrolasa (liberación de arabinosa de arabinoxilano de paja de trigo usando un ensayo ligado a enzima), acetil esterasa (usando sustratos de 4-nitrofenil y 4-metilumbeliferil acetato), actividad acetil xilan esterasa (supervisando la liberación de acetato del xilano de haya acetilado), esterasa de ácido ferúlico (procedimientos de ensayo espectrofotométrico y HPLC).

Las actividades endohidrolasa incluyeron: β -D-(1,3;1,4)-glucanasa (β -glucano de cebada (BBG) o liquenano como sustratos de ensayo), xiloglucanasa (xiloglucano de tamarindo), laminarinasa (laminarano de *Laminaria digitata*), endo-1,4- β -glucanasa, (denominada CMCasa), basándose en la actividad frente a sustrato comercial carboximetilcelulosa, β -mananasa (galactomanano de algarroba) pectinasa y poligalacturonasa, ramnogalacturonasa (ramnogalacturonano de soja), galactanasa (galactanos pécticos de patata y altramuza como sustratos), arabinanasa (arabinano de remolacha azucarera), amilasa, glucoamilasa y dextrinasa.

Temperatura/pH óptimos y estabildades; la temperatura óptima para la actividad se determinó llevando a cabo los ensayos convencionales apropiados a incrementos de temperatura en el intervalo 30-100 °C, en tampón de ensayo normal (NaOAc 100 mM, 5,0). Se tuvo en consideración la variación del pH con la temperatura. Se determinaron los pH óptimos usando los siguientes tampones pH 2,2-7,6: tampón de citrato-fosfato de fuerza iónica constante de tipo McIlvaine; pH 7- pH 10 tampón Tris-HCl. Todos los tampones independientemente del pH se ajustaron a la misma fuerza iónica con KCl.

Se determinaron las estabildades de temperatura y pH como se ha descrito previamente (Tuohy y col., 1993; Gilleran, 2004; Braet, 2005).

Determinación proteica; se estimó la concentración proteica en muestras de enzima (muestras de cultivo en bruto) mediante la modificación de Bensadoun y Weinstein del procedimiento de Lowry (Bensadoun y Weinstein, 1976; Lowry y col., 1951) usando la fracción V de BSA como un patrón (Murray y col., 2001). Electroforesis y zimografía; para determinar el perfil de proteínas presente en los filtrados de cultivo, se concentró un volumen conocido de cada muestra por liofilización y se analizó mediante SDS-PAGE nativo y/o renaturalizante o isoelectroenfoque (IEF; Tuohy y Coughlan, 1992). Se identificaron las bandas activas para endoglicanasa en los geles de SDS-PAGE renaturalizados y geles de IEF usando una modificación de la técnica de superposición de geles de MacKenzie y Williams (1984), (Tuohy y Coughlan, 1992). Para detectar actividad de exoglicosidasa, los geles se incubaron inmediatamente en solución 50-100 pM del derivado apropiado de 4-metilumbeliferil glicósido (periodo de reacción de 2-30 minutos). La banda o las bandas activas de enzimas se visualizaron con luz ultravioleta usando un Multimager Fluor-S™ (Bio-Rad).

Resultados:

Se repitió el cultivo líquido de las cepas al menos 3 veces, en experimentos independientes realizados en diferentes periodos de tiempo. Los filtrados de cultivo recogidos (120 horas) de matraces de repetición (para cada combinación de fuente de carbono/cepa) se ensayaron con respecto a actividad enzimática; se ensayaron múltiples repeticiones en un intervalo de diluciones de enzima. Además, los resultados se validaron mediante mediciones dentro del ensayo y entre los ensayos, y ensayos de independencia de volumen. Hubo claras diferencias entre los cultivos con respecto a apariencia del cultivo y patrón de crecimiento. Por ejemplo, la cepa IMI393751 produjo rápidamente un cultivo bastante denso, filamentoso en glucosa, mientras que varias de las otras cepas (por ejemplo, CBS180.68, CBS355.92, CBS393.64, CBS395.64, CBS397.64, CBS 549.92 y CBS 759.71) presentaron crecimiento limitado y morfología atípica, es decir ausencia de crecimiento filamentoso normal y formación de una masa de cultivo limitada de aspecto viscoso. La cepa CBS394.64 produjo una biomasa de micelio menor, pero creció como un cultivo filamentoso, mientras que CBS472.92 adoptó morfología de gránulos en condiciones de crecimiento idénticas. Se seleccionó un punto temporal de crecimiento de 120 horas, ya que estudios previos han mostrado que las actividades exoglicosidasa y endoglicanasa extracelulares están presentes en cantidades significativas durante el crecimiento de *T. emersonii* en la mayoría de las fuentes de carbono (en condiciones de pH no controlado, se han

observado “picos y valles” de actividades clave. Sin embargo, la actividad máxima se detecta generalmente hacia el final del ciclo de fermentación).

La utilización de glucosa fue solamente de aproximadamente 15-25% a las 120 horas para muchas de las cepas. La cepa CBS 394.64 utilizó ~ 50-55%, mientras que CBS472.92 (que presentó morfología de gránulos) utilizó ~ 20-25% de la glucosa en el medio. Por el contrario, ~95% de la glucosa en el medio de cultivo se utilizó por la cepa de la invención (IMI393751) a las 72 horas y no se detectó glucosa en el medio de cultivo en el punto temporal de recogida de 120 horas.

Las Tablas 31A-D muestran la producción de exoglicosidasas seleccionadas por las cepas. Como revelan los resultados, pueden verse claras distinciones entre la cepa de la invención y otras cepas de *T. emersonii* con respecto a producción de exoglicosidasa.

La glucosa no reprime completamente la producción de exoglicosidasa por las cepas de *T. emersonii* (Tabla 31A). La cepa 393751 produce niveles significativamente mayores de β -glucosidasa (BGasa) que las otras cepas y los segundos mayores niveles de *N*-acetilglucosaminidasa (NAGasa) durante el crecimiento en glucosa. El patrón de producción obtenido para la cepa 393751 contrasta notablemente con el de la cepa CBS549.92 (previamente CBS814.70). La producción de varias actividades exoglicosidasas por la última cepa parece reprimirse por glucosa. Debería observarse que los niveles de actividad exoglicosidasa se midieron en filtrados de cultivo no dializados y dializados en caso de que la glucosa residual en el medio estuviera inhibiendo BGasa y/o NAGasa presentes (se observaron patrones similares en las muestras dializadas).

La algarroba induce producción diferencial de glicosidasas extracelulares por las cepas (Tabla 31B). La cepa CBS 394.64 produce relativamente ninguna actividad exoglicosidasa aparte de α -arabinofuronasidasa. Se produjeron bajos niveles de todas las exoglicosidasas mediante la cepa CBS 393.64, CBS 395.64 y CBS 549.92. La cepa 393751 produjo niveles significativos de una amplia serie de exoglicosidasas (niveles mayores de ciertas actividades, por ejemplo, la exoglicosidasa β -glucosidasa modificadora de pectina).

Producción de endoglicanasa por cepas de *T. emersonii*

A. Producción de xilanasa: dos de los tipos principales de actividades endohidrolasa requeridas para la conversión de biomasa vegetal y restos residuales ricos en polisacáridos no de almidón son glucanasa y xilanasa. De todas las actividades degradantes de glicano polimérico ensayadas, glucanasa y xilanasa fueron las actividades glicanasa predominante presentes.

Las Tablas 32A-D presentan valores para producción de xilanasa por todas las cepas en las mismas fuentes de carbono. Estudios anteriores han mostrado que el tipo silvestre (CBS814.70) y otras cepas mutantes producen un sistema enzimático xilanolítico complejo (Tuohy y col., 1993; 1994), con múltiples endoxilanasas. Varias de las xilanasas aisladas presentan especificidad selectiva para diferentes tipos de xilanos, por ejemplo, arabinoxilanos, arabinoglucuronoxilanos, glucuronoxilanos, más xilanos sustituidos frente a xilanos no sustituidos (a partir de resultados previos y resultados continuados con las enzimas de la cepa de la invención). Como muestran los resultados, la glucosa es un represor fuerte de la expresión de xilanasa en todas las cepas de *T. emersonii*. Se expresan niveles significativos de actividad xilanasa activa frente a arabinoxilano de cascarrillas de avena (OSX) por la cepa 393751. Este componente no es activo frente a arabinoxilanos de centeno o trigo.

La algarroba, que es principalmente rica en galactomananos (contiene algo de xilano), es un inductor potente de niveles muy altos de actividad xilanasa contra todos los sustratos de xilano por la cepa 393751. El papel de la algarroba como un inductor de actividad xilanasa potente no se esperaría basándose en el conocimiento de su composición. La apariencia de los cultivos obtenidos para varias de las cepas CBS (después de 120 horas) fue significativamente diferente y pudieron observarse claras diferencias morfológicas entre las cepas 393751 y CBS549.92, es decir, crecimiento de micelio denso (filamentoso) para IMI 393751 y formación de una masa de cultivo limitada, de aspecto viscoso, (no filamentosa) para la cepa CBS549.92. Como se muestra en la Tabla 31B, los niveles de xilanasa son significativamente mayores para la cepa 393751 que cualquier otra. A diferencia de la cepa 393751, la algarroba es un inductor muy bajo de xilanasa en cepas CBS394.64, CBS395.64 y CBS549.92. Puede verse otra diferencia notable en el tipo de actividad xilanasa inducida por algarroba. En la cepa 393751 se produce actividad potente contra todos los xilanos. En las otras cepas, en general, se produce muy poca o ninguna actividad contra arabinoxilanos de centeno y trigo. Solamente dos cepas distintas de la cepa 393751 producen niveles apreciables de actividad contra ambos de estos xilanos, es decir, CBS472.92 y CBS759.71. El análisis de zimograma del filtrado de cultivo de cepa 393751 reveló altos niveles de múltiples bandas activas para xilanasa, incluyendo una nueva xilanasa bifuncional que se ha aislado.

La mezcla de hojas de té/platos de papel (TL/PPL) también demostró ser un potente inductor de actividad xilanasa en la cepa 393751 (Tabla 32C), y aunque esta mezcla indujo expresión de xilanasa en las otras cepas, los niveles fueron significativamente menores. Como se observó con la algarroba, se produjo actividad potente por la cepa 393751 contra todos los xilanos, obteniéndose una actividad casi 1:8 veces mayor frente a arabinoxilano de centeno (AX de centeno) y menor actividad contra OSX y xilano de abedul. Esto sugiere expresión diferencial de xilanasas individuales por los inductores TL/PPL y algarroba, lo que fue apoyado posteriormente por análisis de zimograma.

TL/PPL también induce un sistema enzimático xilanolítico multicomponente, y actividades esterasa y oxidasa/peroxidasa complementarias en la cepa 393751 y no en las otras cepas. Estas actividades complementarias potencian la eficacia de polisacárido hidrolasas en cócteles de enzimas optimizados para aplicaciones de degradación de biomasa clave (por ejemplo cereales, residuos vegetales, residuos leñosos, productos de papel). En comparación con la algarroba, TL/PPL induce producción de xilanasa mayor por todas las cepas (especialmente actividad contra los arabinoxilanos), pero los niveles son mucho menores que para la cepa 393751. Aunque OSX es un inductor conocido de xilanasa en hongos e indujo producción de enzimas por todas las cepas, la inducción más pronunciada fue con la cepa 393751. Sin embargo, a diferencia de la cepa 393751, solamente OSX indujo actividad xilanasa alta y TL/PPL fue un bajo inductor de producción de xilanasa por la cepa 472.92. El patrón de producción de enzimas en OSX es diferente del obtenido con algarroba y TL/PPL. En general, los resultados para producción de xilanasa en OSX, sugieren que la cepa 393751 puede metabolizar los sustratos en bruto muy rápidamente y eficazmente para generar inductores solubles de xilanasa. La hemicelulosa en sustratos en bruto más complejos es más accesible a esta cepa. Los resultados también sugieren que los cócteles de enzimas producidos por la cepa 393751 en tales sustratos complejos serían más adecuados para hidrólisis de materiales y restos vegetales en bruto complejos. Los estudios de modelo y aplicaciones investigadas hasta la fecha (por ejemplo, conversión de biomasa leñosa, sacarificación de residuos de verduras y alimentos ricos en carbohidratos y OFMSW y cereales) han confirmado el potencial de estos cócteles.

Finalmente, las Figuras 32A-D comparan y contrastan la producción de xilanasa activa frente a los diferentes sustratos de ensayo (es decir, OSX, AX de centeno, etc.) por la cepa 393751 y la cepa parental CBS549.92 (también CBS814.70) en las cuatro fuentes de carbono.

B. Producción de glucanasa y mananasa: estudios previos han mostrado que la cepa de tipo silvestre (CBS814.70) y otras cepas mutantes producen un sistema enzimático glucanolítico complejo (Murray y col. 2001, 2004; Tuohy y col., 2002; McCarthy y col., 2003, 2005), que incluye celulasas y una serie de actividades modificadoras de β -glucano no celulolíticas. Como se ha observado para el sistema xilanolítico, se producen múltiples endoglucanasas, dependiendo de la fuente de carbono. Varias de las β -glucanasas aisladas presentan especificidad selectiva para diferentes tipos de β -glucanos.

Las Tablas 7A-D muestran actividad contra el β -1,4-glucano comercial modificado (CMC) (Sigma Aldrich), β -1,3;1, 4-glucanos de cebada (BBG; Megazyme) y el líquen *Cetraria islandica* (líquenano; Sigma Aldrich), xiloglucano (cadena principal de β -1,4-glucano; Megazyme) de tamarindo y galactomanano de algarroba (Megazyme). Están presentes β -glucanos no celulósicos en concentraciones significativas en el componente polisacárido no de almidón de varios restos vegetales, especialmente los derivados de cereales. Las Tablas 7A-D ilustran inducción diferencial de las actividades respectivas en las cepas, siendo el patrón de inducción completamente diferente en las fuentes de carbono más complejas (en bruto).

La glucosa es un represor potente de producción de glucanasa y mananasa en casi todas las cepas (Tabla 33A). Para todas las muestras, se midieron las actividades en muestras dializadas y no dializadas.

Como revelan los resultados, la algarroba es un inductor potente de niveles altos de β -1,3;1,4-glucanasa (contra BBG y líquenano) en la cepa 393751, los mayores niveles para todas las cepas ensayadas (Tabla 33B). Los niveles de β -1,4-glucanasa (contra CMC) producidos por la cepa 393751 fueron ~10 veces menores que la actividad contra BBG (el nivel de CMCasa fue mayor para esta cepa en comparación con otras cepas). Se detectó xiloglucanasa aún menor, siendo los niveles obtenidos para la cepa 393751 los mayores. El análisis de zimograma confirmó que los tipos de componentes de endoglucanasa, patrón de expresión y niveles relativos de expresión de componentes de glucanasa en los filtrados de cultivos de *T. emersonii* respectivos son notablemente diferentes. Se produjeron bajos niveles de (galacto)mananasa por todas las cepas durante el crecimiento en algarroba.

La mezcla TL/PPL fue un inductor aún más potente de β -1,3,1,4-glucanasa (tanto BBGasa como líquenanasas), y (galacto)mananasa, por la cepa 393751 (Tabla 33C). En general estos resultados destacan la ausencia de equivalencia de producción de β -glucanasa por las cepas de *T. emersonii* y confirman que la cepa 393751 es una excelente fuente de actividades β -glucanasa diferentes y la mezcla TL/PPL induce un cóctel potente de estas actividades.

Como se esperaba, OSX (Tabla 33D), indujo niveles mucho menores de β -glucanasa que algarroba o TL/PPL. El patrón de producción enzimática es diferente para las cepas 393751 y CBS 549.92. En la Tabla 33D, los niveles de β -1,4-glucanasa (actividad carboximetilcelulasa) fueron menores para la mayoría de las cepas excepto CBS 397.64, que produjo niveles dos veces mayores que la cepa 393751 (en OSX como inductor), y no se detectó en filtrados de cultivo de cuatro cepas (es decir, CBS 393.64, CBS 394.64, CBS 395.64 y CBS 549.92). Se produjo actividad (galacto)mananasa significativa durante el crecimiento en OSX por la cepa 393751 (menor que con TL/PPL como inductor) y CBS 472.92. La Figura 6A-E compara y contrasta la producción de glucanasa y mananasa en las condiciones experimentales presentadas por las cepas 393751 y CBS814.70.

En conclusión, los resultados indican que:

la cepa 393751 es un productor potente de altos niveles de una serie de actividades enzimáticas muy

importantes, la cepa 393751 es la única cepa de *T. emersonii* que produce niveles muy altos tanto de xilanasa como de β -1,3;1,4-glucanasa en dos actividades hemicelulasa despolimerizantes clave, en inductores de bajo coste (algarroba y TL/PPL), y los mayores niveles de actividad se obtuvieron en fuentes de carbono en bruto demostrando de este modo que la cepa 393751 es una fuente rentable de una serie potente de cócteles de enzimas.

5

Tabla 31A: Producción de exoglicosidasa después de crecimiento durante 120 horas en glucosa como fuente de carbono

Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)											
Actividad exoglicosidasa	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)	
α -arabinofuranosidasa	3,69	5,83	6,82	5,17	6,00	6,33	2,64	4,73	4,18	3,08	
β -xilosidasa	0,00	0,00	1,49	0,00	0,00	1,60	0,00	1,63	0,00	2,40	
β -Glucosidasa	31,90	1,96	15,42	0,99	0,19	10,67	2,20	2,15	8,97	9,30	
α -Glucosidasa	0,44	0,67	0,09	0,43	1,71	0,00	0,00	0,00	0,00	1,71	
β -Galactosidasa	0,28	1,16	0,00	0,55	0,86	0,00	0,00	0,00	0,00	1,49	
β -Manosidasa	1,30	2,64	1,97	1,60	1,51	1,63	1,10	1,63	0,00	2,15	
β -Fucosidasa	0,00	0,11	0,58	0,22	0,00	0,09	0,00	7,37	0,00	1,10	
N AcetilGlucosaminidasa	86,08	156,97	27,83	33,72	0,00	43,56	59,57	74,91	6,22	34,87	

Tabla 31B: Producción de exoglicosidasa después del crecimiento durante 120 horas en algarroba como fuente de carbono

Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)											
Actividad exoglicosidasa	IMI 393751)	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)	
α -arabinofuranosidasa	0,72	0,22	3,30	1,49	7,04	1,45	1,32	1,05	2,55	1,49	
β -xilosidasa	7,15	0,39	10,29	1,65	0,00	0,77	2,37	16,45	2,60	11,66	
β -Glucosidasa	23,65	17,22	67,54	6,55	0,00	10,04	24,53	85,36	11,25	74,14	
α -Glucosidasa	0,99	0,00	0,44	2,26	0,00	0,91	6,27	0,22	1,64	1,43	
β -Galactosidasa	2,97	4,24	1,71	3,52	0,00	1,95	3,30	1,49	1,73	3,03	
β -Manosidasa	1,16	0,77	1,32	2,42	0,00	0,98	3,19	11,17	1,31	7,04	
β -Fucosidasa	36,58	0,00	4,79	1,76	0,00	0,50	3,19	10,12	0,62	6,55	
N AcetilGlucosaminidasa	31,02	15,95	19,91	3,85	0,00	7,98	14,85	44,55	6,73	18,15	

Tabla 31C: Producción de exoglicosidasa después de crecimiento durante 120 horas en hojas de té/platos de papel como fuente de carbono.
Cepas de *Talaromyces emersonii* (UI/g inductor)

Hojas de té/platos de papel	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)
Actividad exoglicosidasa										
α -arabinofuranosidasa	3,30	1,10	8,53	0,00	25,74	23,93	3,08	0,88	1,87	2,53
β -xilosidasa	6,93	0,00	3,08	0,00	12,49	12,82	1,98	4,18	1,93	1,43
β -Glucosidasa	44,61	20,19	22,72	61,16	9,13	41,20	20,74	32,86	15,51	34,32
α -Glucosidasa	0,44	0,00	3,41	0,00	18,10	7,65	0,83	0,00	0,61	0,44
β -Galactosidasa	2,81	0,00	1,01	0,00	7,26	6,27	3,19	0,00	0,88	2,42
β -Manosidasa	1,16	0,00	3,25	0,00	12,60	12,27	2,48	0,00	1,44	1,98
β -Fucosidasa	18,87	0,00	3,58	0,00	12,05	10,51	2,15	14,96	6,88	1,82
N AcetilGlucosaminidasa	27,23	18,15	9,85	46,04	13,20	45,05	16,78	56,71	25,65	25,91

Tabla 31D: Producción de exoglicosidasa después de crecimiento durante 120 horas en xilano de cascarillas de avena como fuente de carbono.

Xilano de cascarillas de avena

Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)
Actividad exoglicosidasa										
α -arabinofuranosidasa	15,18	2,97	4,07	5,83	23,60	8,91	0,00	1,10	0,00	5,39
β -Xilosidasa	9,63	0,00	2,26	0,66	0,00	2,10	11,77	14,91	12,16	6,93
β -Glucosidasa	32,84	16,83	42,30	24,97	0,00	26,13	15,73	67,27	3,14	61,04
α -Glucosidasa	0,92	0,00	1,05	0,77	0,00	0,17	1,76	0,00	0,44	0,84
β -Galactosidasa	4,68	0,00	0,83	1,49	0,00	1,30	1,43	0,00	0,00	0,00
β -Manosidasa	0,00	0,00	2,09	2,97	0,39	2,75	2,53	0,00	0,11	0,48
β -Fucosidasa	19,64	0,00	0,00	1,60	0,00	1,82	1,65	6,82	0,77	1,26
N AcetilGlucosaminidasa	82,12	20,85	30,86	40,87	0,99	68,15	40,21	118,80	10,89	28,16

Tabla 32A: Producción de xilanasa extracelular por cepas de *T. emersonii* en glucosa como única fuente de carbono

Glucosa como inductor	Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g)									
	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)
Sustrato de ensayo de xilano										
Xilano de cascarillas de avena	513,10	28,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Arabinoxilano de centeno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Arabinoxilano de trigo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Xilano de abedul	254,49	155,98	736,78	147,79	279,13	779,90	0,00	452,87	116,99	0,00

Tabla 32B: Actividad xilanasa extracelular en filtrados de cultivo de *T. emersonii* de 120 h en polvo de algarroba como única fuente de carbono

Algarroba como inductor	Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)									
	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)
Sustrato de ensayo de xilano										
Xilano de cascarillas de avena	3168,55	177,87	610,23	266,81	17,77	217,53	238,10	727,65	283,20	361,19
Arabinoxilano de centeno	1212,20	0,00	0,00	15,07	0,00	0,00	0,00	135,47	90,31	201,30
Arabinoxilano de trigo	2464,00	21,89	116,27	108,08	0,00	0,00	49,28	365,31	9,57	271,15
Xilano de abedul	2520,27	474,76	607,48	513,10	373,45	428,23	348,92	751,30	348,92	636,35

Tabla 32C: Actividad xilanasa extracelular en filtrados de cultivo de *T. emersonii* de 120 h durante crecimiento en Hojas de Té/platos de papel como única fuente de carbono

Hojas de Té/Platos de papel	Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (Ulg de inductor)										
	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 391757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)	
Sustrato de ensayo de xilano											
Xilano de cascarillas de avena	2696,65	124,52	198,39	618,20	166,93	467,94	280,50	287,32	335,23	264,06	
Arabinoxilano de centeno	2398,55	102,63	180,62	522,67	260,15	399,52	441,93	281,88	114,95	254,49	
Arabinoxilano de trigo	2525,60	53,35	123,15	499,40	123,20	351,62	305,09	261,25	170,34	236,01	
Xilano de abedul	2127,40	417,29	458,37	771,65	457,00	626,45	727,65	617,10	647,13	521,29	

Tabla 32D: Actividad xilanasa extracelular en filtrados de cultivo de *T. emersonii* de 120 h durante crecimiento en Xilano de Cascarillas de Avena como única fuente de carbono

Xilano de cascarillas de avena	Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (Ulg de inductor)										
	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)	
Sustrato de ensayo de xilano											
Xilano de cascarillas de avena	2725,25	216,15	287,87	295,35	235,35	262,68	389,95	2126,30	789,47	305,09	
Arabinoxilano de centeno	2009,15	284,51	220,28	384,45	372,13	247,67	351,62	1543,30	723,80	328,35	
Arabinoxilano de trigo	2722,50	180,62	265,43	297,00	191,51	197,01	220,28	1641,75	577,50	281,88	
Xilano de abedul	2196,15	548,68	567,82	695,20	550,00	489,83	584,21	1908,50	871,53	623,92	

Tabla 33A: Glucanasa y mananasa extracelulares presentes en filtrados de cultivo de 120 h de las cepas de *T. emersonii* durante el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono

Glucosa como inductor		Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)										
Sustrato de glucanasa/mananasa	IMI 393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 3937551)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)		
Carboximetil celulosa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
β-glucano de cebada	0,00	0,00	0,00	0,00	77,00	69,25	137,78	95,98	0,00	0,00		
liquenano	0,00	0,00	0,00	0,00	202,46	112,64	0,00	0,00	0,00	0,00		
Xiloglucano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
Galactomanano de algarroba	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

Tabla 33B: Glucanasa y mananasa extracelulares presentes en filtrados de cultivo de 120 h de las cepas de *T. emersonii* durante el crecimiento en algarroba como única fuente de carbono

Algarroba como inductor		Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)										
Sustrato de glucanasa/mananasa	IMI393751	CBS 180.68 (IMI 393753)	CBS 355.92 (IMI 393755)	CBS 393.64 (IMI 393756)	CBS 394.64 (IMI 393757)	CBS 395.64 (IMI 393758)	CBS 397.64 (IMI 393759)	CBS 472.92 (IMI 393760)	CBS 549.92 (IMI 393752)	CBS 759.71 (IMI 393761)		
Carboximetil celulosa	318,34	76,89	246,84	34,93	0,00	64,96	109,40	166,54	7,21	221,71		
β-glucano de cebada	3420,45	145,64	1120,35	81,29	0,00	60,06	281,77	1150,05	45,65	1702,47		
Liquenano	2162,60	135,52	429,39	47,36	0,00	32,01	203,45	431,97	19,91	914,65		
Xiloglucano	180,24	40,15	89,82	45,71	0,00	43,45	39,16	48,68	10,45	112,97		
Galactomanano de algarroba	54,18	108,08	90,15	107,42	110,99	61,05	107,09	94,71	49,01	101,86		

Tabla 33C: Glucanasa y mananasa extracelulares presentes en filtrados de cultivo de 120 h de las cepas de *T. emersonii* durante el crecimiento en Hojas de Té/Platos de Papel como única fuente de carbono

Hojas de té/platos de papel													
Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)													
	IMI393751	CBS 180,68 (IMI 393753)	CBS 355,92 (IMI 393755)	CBS 393,64 (IMI 393756)	CBS 394,64 (IMI 393757)	CBS 395,64 (IMI 393758)	CBS 397,64 (IMI 393759)	CBS 472,92 (IMI 393760)	CBS 549,92 (IMI 393752)	CBS 759,71 (IMI 393761)			
Sustrato de glucanasa/ mananasa													
Carboximetil celulosa	368,61	90,75	147,02	282,10	0,00	131,56	196,90	396,72	257,95	109,40			
β-glucano de cebada	4341,15	393,47	783,20	1818,30	100,54	783,64	804,65	3113,00	1512,50	626,89			
Liquenano	2735,15	452,54	581,90	1239,70	164,56	631,40	611,05	2268,75	1356,85	559,79			
Xiloglucano	192,34	88,83	26,46	171,44	6,16	146,63	77,06	177,65	82,94	39,82			
Galactomanano de algarroba	825,44	845,68	130,96	347,44	313,78	210,65	321,97	339,90	421,52	846,34			

Tabla 33D: Glucanasa y mananasa extracelulares presentes en filtrados de cultivos de 120 h de las cepas de *T. emersonii* durante el crecimiento en Xilano de Cascarillas de avena como única fuente de carbono

Xilano de cascarillas de avena													
Cepas de <i>Talaromyces emersonii</i> (UI/g de inductor)													
	IMI393751	CBS 180,68 (IMI 393753)	CBS 355,92 (IMI 393755)	CBS 393,64 (IMI 393756)	CBS 394,64 (IMI 393757)	CBS 395,64 (IMI 393758)	CBS 397,64 (IMI 393759)	CBS 472,92 (IMI 393760)	CBS 549,92 (IMI 393752)	CBS 759,71 (IMI 393761)			
Sustrato de glucanasa/ mananasa													
Carboximetil celulosa	101,86	32,62	22,22	0,00	0,00	0,00	213,24	64,35	0,00	25,14			
β-glucano de cebada	375,82	100,27	100,87	44,72	21,23	72,49	283,42	282,76	52,58	117,87			
Liquenano	477,68	176,33	197,56	114,62	203,72	135,52	353,27	360,80	115,61	840,40			
Xiloglucano	35,26	44,39	0,00	0,00	3,91	6,88	230,84	25,14	0,00	38,23			
Galactomanano de algarroba	653,84	344,80	56,82	85,53	174,02	95,48	298,38	641,30	110,72	139,10			

Ejemplo 14: Termozimas de *T. emersonii* IMI393751 con potencial para producción de bioenergía

El objeto fue reducir el componente biodegradable de residuos clínicos ricos en celulosa esterilizados, reduciendo de este modo el volumen de residuos para vertedero, y recuperar la producción de líquidos enriquecidos con azúcares después de tratamiento enzimático y recuperar energía en forma de biocombustible.

El flujo de residuos contenía una alta proporción de celulosa (>50%) y consistía principalmente en papel, pañuelos de papel, hisopos médicos y vendas y telas ricas en algodón, algodón en rama, etc. La "fibra" principal en el flujo de residuos es celulosa, pero muchos productos están "acabados" con revestimientos de polisacáridos, agentes aglutinantes y cargas, de modo que es esencial una mezcla de enzimas adyuvantes (concretamente hemicelulasa, pectinasa y enzimas degradantes de almidón) para potenciar la accesibilidad de celulosa y mejorar la reducción de residuos o conversión a azúcares solubles sencillos (por ejemplo, glucosa, galactosa, xilosa, etc.).

Enfoque experimental:

Se determinó el perfil de actividades enzimáticas endohidrolasa y exoglicosidasa en cada uno de los 10 cócteles de termozimas, derivados de la cepa 393751 (Tuohy & Coughlan 1992; Tuohy y col., 1993, 1994, 2002; Murray y col., 2001, 2004). La Tabla 34 resume los niveles relativos de actividades clave determinados en una selección de los cócteles. Las preparaciones enzimáticas se añadieron en diferentes concentraciones a lotes de 100 g de residuos ricos en celulosa tratados con STG, a 50 °C y 70 °C, y se incubaron durante 24-48 h (a niveles de humedad de 50-60%). Las muestras del licor rico en azúcares (y materiales ricos en celulosa, por ejemplo pañuelos de papel, etc.) se retiraron periódicamente durante 48 h y se analizaron con respecto a (i) reducción de peso y volumen, (ii) volumen de licor rico en azúcar recuperado, (iii) azúcares reductores liberados, (iv) estructura física del sustrato después del tratamiento enzimático (usando microscopía electrónica de barrido), (v) análisis cualitativo de los tipos de azúcares liberados por TLC, (vi) análisis cuantitativo de los azúcares producidos por HPLC, CG-EM y ESI-Q-TOF-MS, (vii) sustancias potencialmente tóxicas para microorganismos de fermentación (producción de bioenergía), (viii) esterilidad de los hidrolizados, (ix) producción de bioetanol y (x) producción de biogás, como se describe en Tuohy y col., 1993, 1994, 2002; Murray y col., 2001, 2004, Gilleran (2004) y Braet (2005).

Resultados:**A. Reducción de peso y volumen, volumen de licor rico en azúcares recuperado, azúcares reductores liberados**

Se registraron los pesos antes y después de tratamiento enzimático y se realizaron estimaciones de la reducción del volumen registrado para todas las preparaciones enzimáticas. Se ilustran los datos de reducción de volumen y azúcares reductores obtenidos a 50 °C, usando los mismos parámetros de reacción (carga enzimática, contenido de humedad al 60% y un tiempo de reacción de 24 h) en la Figura 7.

En resumen, 70 °C durante 24 h a 60% de humedad produjo los mejores resultados con respecto a reducción de volumen para todos los cócteles. En estudios repetidos con los 6 cócteles seleccionados (y con ensayos repetidos), la reducción de volumen fue sistemáticamente 60-75% dependiendo del cóctel (véase Figura 8). Los azúcares reductores liberados se convirtieron a porcentaje de hidrólisis o conversión de la celulosa presente, que estaba entre 62-82% de la fracción rica en celulosa presente en los residuos esterilizados iniciales. Se obtuvo una reducción del volumen del 60-75% en ensayos de laboratorio.

Por cada lote de 100 g, se añadieron aproximadamente 70-100 ml de humedad añadida (H₂O) para llevar el contenido de humedad final al 50-60%. Los volúmenes de recuperación de líquidos, después de la hidrólisis enzimática, variaron de 69-105 ml. También se completaron experimentos a temperaturas de reacción de 75-85 °C y diferentes valores de pH. Por encima de 70 °C se observó un aumento mínimo (~2-5,5%) en la hidrólisis global, en comparación con valores obtenidos a 70 °C, y aunque el pH 3,5-4,0 produjo niveles óptimos de hidrólisis, los valores no fueron significativamente mayores (<5%) que los obtenidos usando H₂O.

B. Pérdida física de integridad de sustrato, productos de azúcares generados y cantidades relativas de cada tipo de azúcar. La MEB demostró pérdida significativa de la estructura de las fibras de celulosa (Figura 9B)

Productos de hidrólisis: análisis cualitativo por TLC; análisis cuantitativo por HPLC

>76-92% del azúcar liberado fue monosacárido para los 7 mejores cócteles, y este consistía principalmente en glucosa, con algo de galactosa, manosa y xilosa. Por ejemplo, los niveles de azúcares variaron de 0,2-0,55 g/ml y los intervalos de concentración de monosacáridos por HPLC fueron como sigue (dependiendo del cóctel de termozimas y lote de residuos):

Glucosa: 43-70%; Manosa: 5-15%; Galactosa: 4-10%; Xilosa: 20-30%; Celobiosa: 4-12% y oligosacáridos superiores: 5-26%.

C. Exploración con respecto a sustancias que son potencialmente tóxicas para microorganismos de fermentación (producción de bioenergía), antes y después de la fermentación, análisis de esterilidad de hidrolizados y producción de bioetanol y biogás

La fracción líquida recuperada no parecía ser tóxica para especies de levadura exploradas con respecto a fermentación de los hidrolizados ricos en azúcares a bioetanol, es decir no evitó el crecimiento de *S. cerevisiae* (levadura de panadero), *Pachysolen tannophilus*, *Pichia sp.*, *Candida shehatae* y *Kluveromyces marxianus*. Además, el análisis de producción de etanol (usando un kit de ensayo ligado a enzima) indicó que las levaduras producían etanol.

Se inocularon placas de agar (que contenían el medio de agar apropiado) con muestras de los licores ricos en azúcares y desperdicios residuales, se incubaron en las condiciones recomendadas (para el microorganismo) y se analizaron con respecto a la presencia de colonias (bacterias y levaduras) y crecimiento radial (hongos filamentosos). No se produjo crecimiento microbiano en placas inoculadas con los licores ricos en azúcares y muestras de residuos de los tratamientos enzimáticos a 70 °C, es decir no se produjo deterioro microbiano (y pérdida de azúcares) de los hidrolizados de residuos.

Producción de bioetanol

Se evaluó la producción de bioetanol a partir de materias primas ricas en azúcares por diferentes especies de levadura como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia sp.*, *Candida shehatae* y *Kluveromyces marxianus* (y cepas). Los criterios de valoración medidos incluyeron crecimiento de levadura (y biomasa de levadura), utilización de azúcares, evolución de CO₂ y etanol producidos. Se seleccionaron dos de las digestiones enzimáticas a 70 °C (hidrolizados generados por cócteles 5 y 8 en la Figura 8) como las materias primas de ensayo para producción de bioetanol por todas las especies de levadura en cultivos a escala de laboratorio de 1 l.

Las Figuras 10A y B ilustran los perfiles de producción de etanol obtenidos con *S. cerevisiae*. Los rendimientos de etanol son similares con ambas materias primas, incluso aunque el cóctel de termozimas 8 produce mínimamente más azúcares sencillos en el hidrolizado. Sin embargo, el producto de digestión del cóctel 8 contiene más pentosa (no fermentada por *S. cerevisiae*) que la generada por el cóctel de termozimas 5. El producto de digestión del cóctel de termozimas 5 contiene algo de celobiosa (y cantidades menores de celooligosacáridos) que se metabolizan fácilmente por la levadura.

Tabla 34 resultados para varias combinaciones de productos de digestión ricos en azúcares + levadura

Especie de levadura	Producto de digestión de cóctel de termozimas 5	Producto de digestión de cóctel de termozimas 8
<i>S. cerevisiae</i>	Etanol 9,2 g/l	Etanol 9,4 g/l
<i>P. tannophilus</i>	Etanol 8,5 g/l	Etanol 8,8 g/l
<i>K. marxianus</i>	Etanol 9,6 g/l	Etanol 8,4 g/l
<i>A. pullulans</i>	Etanol 6,7 g/l	Etanol 7,4 g/l
<i>C. shehatae</i>	Etanol 6,3 g/l	Etanol 5,4 g/l

Análisis de productos de final de fermentación potencialmente tóxicos.

Se usó una serie de técnicas (HPLC, EM), especialmente CG-EM, para determinar la presencia de productos de final de fermentación potencialmente tóxicos. Se consiguió utilización de azúcares casi completa (con la excepción de productos de digestión ricos en azúcares de pentosa (xilosa, arabinosa) para *S. cerevisiae*, y se detectaron productos de final de fermentación normales, es decir glicerol, acetato y algunos productos secundarios traza (disolventes).

Producción de biogás

Se prepararon lotes mayores de productos de digestión de Cóctel 5 y 8 para alimentar los digestores anaerobios de Reactor Híbrido Anaerobio de Flujo Superior (UAHR) termófilos y mesófilos. Se midieron los niveles de carbohidratos totales de las entradas y salidas de ambos reactores (Dubois y col. 1956; protocolo de Laboratorio). Se determinaron los azúcares reductores presentes en muestras de entrada y salida (Tuohy y col., 1994). Para determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO), se oxidó un volumen conocido del hidrolizado usando dicromato potásico (ácido sulfúrico concentrado con sulfato de plata como catalizador), durante 2 horas (procedimiento de ensayo internacional: protocolo de Laboratorio). El dicromato restante se determinó mediante valoración con una solución normalizada de sulfato de amonio ferroso. Se midió la eficacia de retirada de carbohidratos y DQO (muestras diarias) a lo largo del ensayo. Se analizó la actividad metanogénica específica (AME) de las aguas residuales usando la técnica del transductor de presión (Colleran y Pistilli, 1994; Coates y col. 1996). Se retiró una muestra de agua residual del lecho de agua residual a través de un orificio de salida y se llevaron a cabo ensayos a 37 °C (para agua residual de reactor mesófilo) o 55 °C (para agua residual de reactor termófilo).

Los azúcares presentes en las digestiones generadas de forma enzimática se metabolizaron rápidamente por las bacterias en UAHR tanto mesófilos (37 °C) como termófilos (55 °C), es decir reducción del 95-97% de carbohidratos a velocidades de carga de 4,5 g DQO/m³/día, en condiciones no optimizadas. Los niveles de metano en el flujo de biogás obtenido estuvieron entre 55 y 61%, y el tiempo de retención estimado (días) que se tardó en metabolizar

todo el azúcar y alcanzar los niveles máximos de metano fueron ~3,0-4,0 días. El pH de la salida se supervisó y no hubo cambio observable del pH de las salidas de ninguno de los reactores.

C. Optimización de los sistemas de termozimas para tratamiento de flujos de residuos clínicos ricos en celulosa.

- 5 Se usó una combinación de genómica y proteómica funcional para identificar las condiciones de crecimiento óptimas y sustratos para usar (basándose en información de los 10 cócteles usados en los experimentos iniciales) para obtener un cóctel de enzimas que tendría niveles óptimos de todos los componentes enzimáticos clave. Se seleccionaron dos combinaciones inductoras: una mezcla 1:1 de hojas de té gastadas y platos de papel residuales, y una mezcla 1:1 de sorgo y pulpa de remolacha no melazada. También se prepararon mezclas adicionales de cócteles seleccionados de los 10 usados anteriormente. El nuevo cóctel y las mezclas se caracterizaron con respecto a las enzimas componentes y su capacidad para catalizar conversión exhaustiva de celulosas comerciales, hemicelulosas y residuos ricos en celulosa esterilizados en azúcares fermentables sencillos. Se determinaron el pH y la temperatura óptimos para reactividad enzimática máxima, termoestabilidad del sistema enzimático optimizado y cócteles mezclados, e inhibición potencial por producto o productos finales de reacción, los azúcares sencillos o moléculas tóxicas potenciales (compuestos fenólicos/derivados de benceno).

Temperaturas óptimas: 75-80 °C, con >70-85% de actividad restante a 85 °C, dependiendo de la preparación enzimática/mezcla (la actividad enzimática se detectó a 90-95 °C).

Termoestabilidad: no hubo verdadera pérdida de actividad después de 24 h a 50 °C y <5-10% de pérdida de actividad después de 1 semana a la misma temperatura.

- 20 A 70 °C, <2-20% de pérdida de actividad en las primeras 24 h, con <10% de pérdida adicional de actividad a continuación durante un periodo de 5 días.

pH óptimos: aunque las enzimas estaban más activas a entre pH 4-5, se observó >60% de actividad a pH 3,0 y pH 6,8, presentando aún todas las enzimas actividad a pH 7,0. Las preparaciones enzimáticas eran más estables entre pH 3,5 y 6,0 (4-50 °C, durante un periodo de 1 semana).

- 25 Aunque la tasa de reacción/conversión de sustrato a monosacáridos se redujo o alcanzó una meseta cuando estaban presentes altas concentraciones de glucosa y otros monosacáridos, las preparaciones enzimáticas aún estaban bastante activas en presencia de altas concentraciones (hasta 100 nM) de monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa). Además, aunque los compuestos fenólicos/derivados de benceno redujeron la actividad global de los cócteles, las concentraciones usadas en los ensayos fueron significativamente mayores que las presentes potencialmente en los residuos. No obstante, ciertos cócteles y el cóctel enzimático optimizado presentaron actividad significativa (>50-70%) en presencia de estos compuestos.

- 35 En general, las concentraciones de cada enzima requeridas para conseguir valores de hidrólisis de ~65-75% fueron sorprendentemente bajas (9-16 unidades de celulasa/10 g de residuos) y, aunque eran dependientes de cóctel/mezcla, las dosificaciones mayores (hasta 60 unidades de celulasa) no aumentaron el grado final de hidrólisis de forma notable. El aumento de escala del tratamiento enzimático a lotes de 100 y 10 Kg produjo un grado de hidrólisis final similar, y un perfil y concentración de productos de azúcares similares. Los mejores valores de reducción de volumen obtenidos para los cócteles optimizados fueron del 73-80%, mientras que los valores de % de hidrólisis correspondientes para conversión de la fracción celulósica a azúcares sencillos fueron 72-81%. Dos de las mezclas optimizadas produjeron puntos finales similares con respecto a reducción de volumen e hidrólisis de celulosa. El rendimiento de etanol obtenido fue de 195-210 l/tonelada con *S. cerevisiae* y 215-220 l/tonelada con *P. tannophilus*. Aproximadamente 80-85% del bioetanol pudo recuperarse por destilación, pero esto podría mejorarse.

Ejemplo 15: termozimas de *T. emersonii* IMI393751 para generación de materias primas ricas en azúcares, a partir de residuos de papel y pañuelos de papel ricos en celulosa

Mediciones de la actividad enzimática:

- 45 Se realizaron preparaciones de enzima en bruto para una serie de actividades enzimáticas de hidrólisis de lignocelulosa diferentes usando concentraciones de 10-30 mg/ml de los sustratos relevantes para enzimas de acción interna, 50 mg de papel de filtro/ml de volumen de reacción para "filter paperasa" (celulasa general) o 1 mM del derivado de 4-nitrofenil-glicósido apropiado (Tuohy y col., 2002; Murray y col., 2001). Se realizaron ensayos por triplicado. Todos los resultados son representativos de dos experimentos idénticos usando diferentes preparaciones enzimáticas en bruto.

Requisitos de pH y temperatura para actividad y estabilidad:

Los requisitos de pH y temperatura para actividad y estabilidad enzimáticas se evaluaron a lo largo del intervalo de pH de 2,6-7,6, y a lo largo de un intervalo de temperatura de 30-90 °C, usando los procedimientos de ensayo normales.

- 55 **Estudios de hidrólisis de escala de modelo:**

Se incubó una alícuota de enzimas individuales, que contenía 5-60 UPF (o 2-20 unidades de xilanasas, según sea

apropiado), con 1 g del sustrato diana, al pH y la temperatura de reacción apropiados, durante hasta 24 h. Las muestras se retiraron a intervalos temporalizados y se analizó el contenido y composición de azúcares (azúcares reductores).

Sustratos ricos en celulosa investigados: papel higiénico y pañuelos de papel mixtos, residuos de papel de oficina, papel marrón, papel de periódico mixto.

Sumario de resultados: los cócteles de termozimas presentaron alta actividad en un espectro amplio de sustratos de carbohidratos y por lo tanto reflejan la complejidad y eficacia de la producción de enzimas por *T. emersonii* IMI393751. La producción de termozimas particulares reflejó la composición y variación de sustrato inductor (Tabla 35).

Tabla 35: cantidades relativas de enzimas hidrolizantes de celulosa y hemicelulosa

Actividad	Cócteles MGBG 2	UI/g de Inductor					
		MGBG 3	MGBG 4	MGBG 5	MGBG 6	MGBG 7	MGBG 8
β-glucosidasa	26,4	240,35	90,75	134,2	114,4	119,9	36,85
Endocelulasa	710,6	468,6	310,2	747,45	799,15	70,4	919,6
Endo 1,3,1,4 glucanasa	4471,5	3199,9	2067,45	8004,7	9493	313,5	6207,85
Endoxilanasas	1234,2	1646,15	1051,6	1429,45	1369,5	653,95	1731,4
Filterpaperasa	216,7	205,7	271,15	155,65	146,85	105,6	172,15
β-xilosidasa	8,25	4,125	9,24	11,77	11,715	5,17	5,335
αArabinofuranosidasa	4,29	33,33	17,105	34,87	20,24	7,205	23,155
β-galactosidasa	10,175	137,5	6,82	42,79	13,695	1,98	115,5
Pectinasa	173,25	358,6	119,9	168,85	157,3	19,25	429,55

MGBG 2, derivado de cultivos de *T. emersonii* de 108 h crecidos en una mezcla 1:1 de hojas de té gastadas/platos de papel; MGBG 3, derivada de cultivos de *T. emersonii* de 120 h crecidos en una mezcla 1:1 de sorgo/pulpa de remolacha; MGBG 4, derivada de cultivos de *T. emersonii* de 120 h crecidos en una mezcla 1:1 de salvado de trigo/pulpa de remolacha; MGBG 5, derivado de cultivos de *T. emersonii* de 120 h crecidos en una mezcla 1:1 de platos de papel/pulpa de remolacha; MGBG 6, derivado de cultivos de *T. emersonii* de 120 h crecidos en una mezcla (2:1:1) de papel marrón/platos de papel/pulpa de remolacha; MGBG 7, derivado de cultivos de *T. emersonii* de 120 h crecidos en una mezcla 1:1 de copos de centeno/salvado de trigo; MGBG 8, derivado de cultivos de *T. emersonii* de 120 h crecidos en una mezcla 1:1 de pulpa de remolacha/hojas de té gastadas.

La celulasa en los cócteles de termozimas fue más activa a aproximadamente pH 4,0 (Figura 11A) y entre 70 °C y 80 °C (Figura 12). El componente o los componentes de celulasa en cada preparación enzimática están activos a lo largo de un intervalo de pH amplio (<pH 2,6 - >pH 6,5). La actividad xilanasas presente en los mismos cócteles estaba más activa a pH 4,0-5,0 (Figura 11B) y entre 75-85 °C (Figura 13). Sin embargo la actividad xilanasas en los cócteles estaba activa a lo largo de un intervalo de pH amplio (<pH 2,6 a >pH 7,0), mientras que se observaron niveles de actividad similares a 90 °C y 50 °C.

La estabilidad térmica de varios de los cócteles de MGBG (enumerados en la Tabla 35) se reflejó en los largos valores de semivida a 50 °C y 70 °C, es decir, de hecho sin pérdida o con pérdida mínima de actividad endoxilanasas o endocelulasas a 50 °C después de incubación en tampón solamente (pH 5,0). Todos los cócteles fueron preparaciones enzimáticas en bruto y no se añadieron estabilizadores o potenciadores. La actividad xilanasas presente en los cócteles 2, 5, 6 y 8 fue particularmente estable a 70 °C (pérdida de solamente aproximadamente <2-20 % de actividad xilanasas después de 25 h). Por ejemplo, el valor de $t_{1/2}$ del cóctel 2 a 70 °C fue mayor de 6 días. Las estabilidades a 70 °C de los cócteles 3 y 4, y en menor grado cóctel 7, fueron menores debido a la presencia de altos niveles de proteasa ecolisina ($t_{1/2}$ de 2 h, 12 h y 25 h). En presencia de sustrato (es decir, residuos en bruto), la estabilidad de los tres cócteles fue notablemente mayor, es decir, (valores $t_{1/2}$ de 22 h, 46 h y 72 h). El rendimiento general de los cócteles de MGBG en sustratos de celulosa y hemicelulosa fue muy alto (Tabla 36). El nivel de hidrólisis aumentó significativamente a medida que aumentó la temperatura de la reacción de 50 °C a 70 °C (Tabla 37). A las temperaturas de reacción mayores (por ejemplo 70 °C), el porcentaje de hidrólisis se consiguió en 18 h. y fue similar a, y en algunos casos mayor que, el porcentaje de hidrólisis obtenido después de 24 h a 50 °C (Tabla 37). Este hallazgo destaca la ventaja de las termozimas en comparación con las enzimas de organismos mesófilos, que serían activas a temperaturas menores.

Tabla 36: % de hidrólisis de materiales ricos en celulosa

Sustrato	Cócteles 2	% de hidrólisis (50 °C)					
		3	4	5	6	7	8
Papel higiénico	37,9	85,6	9,8	9,7	47,4	22,4	22,6
Vasos de papel	17,6	20,0	16,1	27,5	34,2	16,3	26,2
Papel de filtro	18,3	23,7	7,2	17,4	18,8	0,0	20,7
β- glucano de cebada	72,6	90,1	60,2	83,3	80,4	78,7	61,9

Tabla 37: % de hidrólisis de pañuelo de papel rico en celulosa

	MGBG 2	MGBG 3	MGBG 4	MGBG 5	MGBG 6	MGBG 7	MGBG 8
24 horas a 50 °C	70	87	51	79	80	66	71
18 horas a 70 °C	68	89	68	66	74	61	67

Los productos de la hidrólisis en ciclo temporal de celulosa y hemicelulosa, que se analizaron por TLC, han confirmado la alta eficacia de conversión de las termozimas MGBG. Los sustratos polisacáridos se degradaron inicialmente en oligosacáridos y finalmente en glucosa, que era casi el único producto de hidrólisis, mientras que la celulosa presente en residuos ricos en celulosa, por ejemplo pañuelos de papel, se hidrolizaron de forma similar casi completamente a glucosa.

Las implicaciones de estos resultados para la industria basada en bioetanol son significativas e indican el potencial de los sistemas de termozimas de *T. emersonii*.

Ejemplo 16: Bioconversión de pulpa de remolacha en hidrolizados ricos en azúcares para producción de Bioetanol.

Se seleccionaron ocho cócteles de termozimas a partir de una serie inicial de 20 cócteles. Se determinó el perfil de las actividades endohidrolasa y exoglicosidasa en cada uno de ocho cócteles de termozimas, derivados de la cepa 393751 (Tuohy & Coughlan, 1992, Tuohy y col., 1993, 1994, 2002; Murray y col., 2001, 2004).

Las preparaciones enzimáticas se combinaron en diferentes concentraciones o dosificaciones con lotes de 1 g De fracciones de remolacha azucarera, preparadas usando diferentes procedimientos de extracción. Las fracciones fueron como sigue:

- A. Partes superiores y tallos de remolacha azucarera (1 g de peso seco / 10 ml de volumen total)
- B. Pulpa de remolacha azucarera (1 g de peso seco / 10 ml de volumen total)
- C. Fruto de la remolacha azucarera (1 g de peso seco)
- D. Piel de la remolacha azucarera (1 g de peso seco)

Se homogeneizaron las fracciones de remolacha azucarera A-D en un mezclador Waring (2 x 30 ráfagas de 30 segundos). Se añadieron alícuotas de enzima, es decir 2 ml y 5 ml de soluciones de enzimas (1-8) a un volumen de reacción total final de 10 ml (con agua del grifo, pH 7,2) y se incubaron a 63 °C inicialmente. Se realizaron experimentos adicionales para optimizar la temperatura de reacción (75 °C), pH (pH 4,0) y para reducir el tiempo de incubación (16 horas). Se tomaron muestras a intervalos temporalizados durante la incubación de 16-48 horas, se centrifugaron, y se terminó la acción enzimática hirviendo a 100 °C durante 10 min. La fracción de sobrenadante se analizó con respecto a azúcares reductores liberados.

Se analizó el análisis cualitativo de los tipos de azúcares liberados por TLC, y se determinó el análisis cuantitativo de los azúcares producidos por HPLC. Las materias primas ricas en azúcares se evaluaron con respecto a producción de bioetanol (Tuohy y col., 1993, 1994, 2002; Murray y col., 2001, 2004; Gilleran, 2004; Braet, 2005).

Resultados:

Las condiciones de reacción óptimas fueron 75 °C y pH 4,0. La tabla 38 presenta los azúcares reductores liberados después de 16 horas en condiciones óptimas. El aumento de la incubación a 48 horas aumentó el porcentaje de hidrólisis en el caso de las fracciones de piel y fruto. La optimización de las condiciones de carga enzimática permitieron que el tiempo de incubación se redujera en la mitad (es decir 24 horas) con los rendimientos mostrados en la Tabla 39.

Tabla 38: % de hidrólisis del carbohidrato presente después de 16 horas a 75 °C

Sustrato	Cócteles	% de hidrólisis (75 °C) después de 16 horas					
	2	3	4	5	6	7	8
Pulpa	35,5	91,1	48,8	38,5	59,8	37,4	48,6
Piel	12,8	32,7	5,8	14,8	7,8	9,8	20,0
Fruto	13,8	6,4	3,0	26,0	11,5	3,0	20,7

Tabla 39: % de hidrólisis del carbohidrato presente después de 24 horas a 75 °C con cargas enzimáticas optimizadas

Sustrato	Cócteles	Hidrólisis (75 °C) – mg RS después de 48 horas					
	2	3	4	5	6	7	8
Pulpa	84,4	90,8	85,4	88,4	69,9	82,5	90,0
Piel	86,3	79,8	38,5	53,2	77,5	81,6	67,5
Fruto	66,6	75,5	59,1	104,1	79,5	85,4	102,2

Se emprendió desarrollo y optimización de un cóctel de enzimas para efectuar hidrólisis usando una combinación de genómica y proteómica funcional (basándose en información de los 8 cócteles usados en los experimentos iniciales). Se produjeron dos cócteles, marcados MGBG SB#1 y MGBG SB#2. Se comparó la hidrólisis de la planta de remolacha azucarera total y el componente de fruto total por los dos cócteles optimizados con los cócteles 3 y 5 de los experimentos anteriores. Se analizaron reacciones en las condiciones óptimas para los dos nuevos cócteles, es decir 71 °C y pH 4,5. La Tabla 40 proporciona los niveles relativos de enzima incluidos en cada reacción por gramo de sustrato (es decir, planta de remolacha azucarera total o el componente de fruto total). Las Tablas 41 y 42 resumen los resultados de hidrólisis obtenidos.

Tabla 40: Cargas enzimáticas por gramo de sustrato de remolacha azucarera

Actividad	Cóctel 3	Cóctel 5	MGBG SB#1	MGBG SB#2
Xilanasas	4,8	4,98	0,68	0,20
Celulasas (FPasa)	1,64	1,12	0,12	1,22
Pectinasas	0,96	2,26	0,30	0,56

Las principales diferencias entre los cócteles optimizados y los cócteles 3 y 5 estuvieron en las cantidades relativas de actividades clave, especialmente exoglucosidasas.

Tabla 41: % de hidrólisis basado en los azúcares reductores liberados (71 °C, pH 4,5) después de 24 horas.

	Cócteles (% de Hidrólisis) - RS			
Sustrato	3	5	MGBG SB#1	MGBG SB#1
Fruto de remolacha	56,8	46,9	65,6	58,3
Planta total	51,8	68,3	97,5	87,8

Tabla 42: % del azúcar total liberado que corresponde a glucosa

			Cócteles	
Sustrato	3	5	MGBG SB#1	MGBG SB#1
Remolacha	116,8	90,3	112,0	97,9
Planta total	95,0	65,6	67,1	43,2

Ambos cócteles nuevos liberaron altos niveles de azúcar reductor del homogeneizado de planta total. De los azúcares reductores liberados aproximadamente 88-90 % fueron monosacáridos de los que aproximadamente el 43-67 % fue glucosa.

Fermentación a bioetanol

Se realizaron estudios para investigar la producción de bioetanol a partir de los hidrolizados de remolacha y planta total. Más del 90 % de la glucosa presente en el hidrolizado de planta total se convirtió a bioetanol por *S. cerevisiae* (a partir de azúcar fermentable 40 g/l, se obtuvo etanol aproximadamente a 9,0 g/l). Se investigaron otras especies de levadura con respecto a producción de bioetanol (condiciones aerobias), por ejemplo *Pachysolen tannophilus*. La última levadura utilizó azúcares de glucosa y pentosa liberados (xilosa y arabinosa) en fermentaciones repetidas (>92-95 % del metabolismo). Sin embargo, los rendimientos de etanol fueron ligeramente menores que con *S. cerevisiae* (a partir de azúcar fermentable 40 g/l, se obtuvo etanol aproximadamente 6,7 g/l).

Propiedades bioquímicas seleccionadas de los nuevos cócteles.

Temperaturas óptimas: 75-80 °C, con >75-87 % de la actividad restante a 85 °C, dependiendo del cóctel.

Termoestabilidad: sin pérdida real de actividad después de 24 horas a **50 °C** y <10% después de 3 semanas a **50 °C**. A **71 °C**, aproximadamente 4-9 % de pérdida de actividad en las primeras 24 horas, con < 5-7 % de pérdida adicional durante 5 días.

pH óptimos y estabildades: aunque ambos cócteles estaban más activos a pH 4,5, se observó >55 % de la actividad a pH <2,6 y >50-60 % a pH 6,8; ambas enzimas presentaron actividad significativa (>48-58 %) a pH 7,0. Las preparaciones enzimáticas fueron más estables entre pH 3,5-6,0 (4-50 °C, durante 1 mes).

Ejemplo 17: Identificación y propiedades seleccionadas de una nueva xilanasa bifuncional producida por *Talaromyces emersonii* IMI393751.

Talaromyces emersonii secreta entre 14 y 20 componentes de endoxilanasas distintos cuando se cultiva en la fuente de carbono apropiada. Trece de estas endoxilanasas se han purificado hasta su homogeneidad y se han caracterizado con respecto a propiedades catalíticas. Los pesos moleculares de las endoxilanasas purificadas varían entre 30-130 kDa. La expresión de xilanasa y glucanasa no es equivalente entre 10 cepas de *T. emersonii* cultivadas en condiciones idénticas en el mismo medio nutriente e inductores de carbono. Se ha identificado una nueva xilanasa de bajo peso molecular, Xyn XII (17,5 kDa) a partir de la cepa de *T. emersonii* IMI393751 del sistema degradante de xilano. Se ha indicado secreción de xilanasas con valores de M_r menores de o iguales a 20 kDa para varias otras especies fúngicas y bacterianas, pero no para *T. emersonii* antes de esto.

Purificación y caracterización de enzimas

Se cultivó *T. emersonii* IMI393751 en una mezcla 1:1 de salvado de trigo y pulpa de remolacha durante 120 horas a 45 °C, 210 rpm (o como alternativa durante 11 días en fermentación sólida (estática), sustrato 33 %: humedad 67 %; a 45 °C). Se analizaron los contenidos de xilanasa y proteína de muestras de enzimas en bruto y fraccionadas como se ha descrito previamente (Tuohy & Coughlan, 1992; Tuohy y col., 1993,1994; Murray y col., 2001). Se recogió extracto de enzima en bruto como se ha descrito previamente (Tuohy & Coughlan, 1992). Se usó ultrafiltración usando un sistema Amicon DC2, equipado con un dializador de fibra hueca HIP 10-43 para separar la nueva xilanasa (fracción permeada) de las xilanasas de mayor peso molecular (retenido). Xyn XII se purificó hasta su homogeneidad usando una combinación de técnicas de fraccionamiento, incluyendo "precipitación por la adición de sal" o precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (corte de 0-90 %), cromatografía de permeación en gel (GPC) en Sephacryl S-200 SF (Tampón de NaOAc 100 mM, pH 5,0 como eluyente), cromatografía intercambio iónico (IEC) en Whatman DE-52 (equilibrado con tampón de NaOAc 30 mM, pH 5,0; se eluyó xilanasa mediante aplicación de un gradiente de NaCl 0,0-0,3 M tamponado lineal), seguido de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en Fenil Sepharose CL-4B (equilibrado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 % en NaOAc 30 mM, pH 5,0). Antes de la HIC, la muestra de xilanasa se "disolvió por adición de sal" con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una concentración final de 15 % (p/v). Se retiraron las sales de tampón y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mediante aplicación de la muestra a Sephadex G-25 (no mostrado aquí). Finalmente las fracciones ricas en xilanasa se fraccionaron adicionalmente mediante aplicación a una segunda columna de intercambio aniónico de DE-52, a pH 7,0, seguido de cromatografía de permeación en gel en Sephacryl S-100 HR (tampón NaOAc 100 mM, pH 5,0 usado como tampón de equilibrio e irrigación) y se usó una etapa de fraccionamiento final en DEAE-Sepharose, preequilibrado con tampón NH_4OAc 50 mM, pH 5,5 (gradiente de NaCl 0,0-0,2 M usado para eluir xilanasa). La enzima agrupada se desaló mediante aplicación a Sephadex G-25 o BioGel P-6 y se liofilizó antes del análisis electroforético.

Propiedades seleccionadas de la nueva xilanasa bifuncional

Propiedades fisicoquímicas seleccionadas

La pureza de la nueva enzima se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en geles de (acrilamida/bis-acrilamida) al 15 %, de acuerdo con el procedimiento de Laemmli. El SDS-PAGE reveló una banda proteica única en tinción de plata que se correspondía a una M_r estimada de 17,5 kDa. Además, se obtuvo una banda proteica única en IEF correspondiente a un valor de pI de pH 5,0 para Xyn XII. Se determinó que la temperatura óptima para la degradación catalizada por Xyn XII de OSX era 75 °C, y el pH óptimo para la actividad era pH 4,0 – 4,5. Sin embargo, a diferencia de Xyn I - XI, que perdía entre 25-81 % de las actividades originales respectivas durante un periodo de incubación de 10 minutos a pH 3,0, Xyn XII era notablemente estable ante ácido y conservó más del 91 % de su actividad original a pH 3,0 incluso en incubación prolongada.

Propiedades catalíticas seleccionadas

Se incubaron alícuotas diluidas de forma adecuada de Xyn XII con una serie de polisacáridos, incluyendo diversos xilanos, β -glucanos, polímeros péclicos y fructano (todos a concentración de 1,0 % (p/v)). Se cuantificaron los azúcares reductores liberados durante un periodo de incubación prolongado de 30 minutos como se ha descrito anteriormente. Se determinó la actividad contra aril-glicósidos (1,0 mM) usando un procedimiento de microensayo (Murray y col., 2001). Se llevaron a cabo estudios preliminares para determinar las constantes cinéticas variando la [sustrato], xilano, entre 0,2 y 25 mg/ml, en las condiciones de ensayo normales.

Los resultados presentados en la **Figura 14** ilustran la reactividad relativa de la nueva xilanasa (Xyn XII) frente a diferentes xilanos. Esta enzima es más activa en un xilano no sustituido de enlace mixto (1,3;1,4- β -D-xilano)

conocido como rodimenano del alga roja *Palmaria palmata*. Por el contrario, de los dos arabinoxilanos de cereales, es decir OSX y WSX, la enzima presentó mayor actividad contra el WSX sustituido. El patrón global de reactividad fue: RM >WSX>LWX>OSX>BWX.

Como demuestran las **Figuras 15A-G** las preferencias se sustrato de varias de las otras xilanasas (Xyn IV a Xyn XI) son bastante distintas de Xyn XII.

Con Xyn IV, OSX>RM>WSX>LWX>>>BWX (Figura 15A). El orden de reactividad con Xyn VI es OSX>LWX>RM>BWX>WSX (Figura 15B), mientras que la representada por Xyn VII es RM>LWX>WSX>BWX>>OSX (Figura 15C). La reactividad de Xyn VIII fue RM>BWX>WSX>>LWX>OSX (Figura 15D), y Xyn IX fue RM>LWX>BWX>OSX>WSX (Figura 15E). Finalmente Xyn X presentó la siguiente preferencia RM>>BWX>WSX>OSX >>>LWX (Figura 15F) y Xyn XI RM>LWX>WSX>BWX>OSX (Figura 15G).

Además, la diferencia de Xyn I-XI que eran estrictamente activas contra xilanos solamente, la nueva xilanasas bifuncional (Xyn XII) presentó actividad sustancial contra β -glucano de enlace mixto de cebada (1,3;1,4- β -D-glucano), es decir, más del 55 % de actividad en relación con la observada OSX, el sustrato de ensayo normal (Figura 16). A diferencia de Xyn I-XI, la nueva xilanasas bifuncional presentó actividad contra los aril- β -xilósidos 4-nitrofenil β -D-xilósido (4NPX) y cloronitrofenil β -D-xilósido (CNPX), con mayor actividad contra el segundo sustrato (Figura 17). Este hallazgo puede reflejar el efecto de retirada de electrones del resto de cloro, haciendo al grupo cloronitrofenilo un mejor "grupo saliente". Sin embargo, otras nuevas endoxilanasas de la cepa CBS814.70 de *T. emersonii* (Tuohy y col., 1993; también producidas por la cepa IMI393751, aunque expresadas de forma diferente) son significativamente activas contra CNPX y presentan poca o ninguna actividad contra 4NPX. Este fenómeno reflejó las características de acción "externa" parciales de estas enzimas, y también pueden reflejar una característica similar para Xyn XII. Además, se observó baja actividad contra 4NP β -glucósido y CNP- β -celobiósido, lo que no era inesperado ya que Xyn XII es activa contra 1,3;1,4- β -D-glucano y si posee algunas propiedades de acción externa, como se observó con los aril β -xilósidos, podría esperarse que tuviera actividad correspondiente contra los aril β -glucósidos. No se observó reactividad contra ningún otro aril glicósido ligado a α o β .

Por lo tanto, "in vivo", esta nueva xilanasas bifuncional puede desempeñar un papel muy importante para *T. emersonii* IMI393751 al proporcionar acceso a hemicelulosa de la pared celular de la planta, por ejemplo, degradando glucanos de enlace mixto en cereales y otras plantas, restos y residuos vegetales.

Ejemplo 18: Expresión de hidrolasas clave y otras enzimas adyuvantes por cepas de *T. emersonii*.

La expresión de enzimas clave en la misma fuente de carbono es diferente

El número, tipo y abundancia relativa de xilanasas o xilanasas producidas por *T. emersonii* IMI393751 y de otras cepas son diferentes. Como se ha mostrado anteriormente, los niveles de enzimas en filtrados de cultivo son notablemente diferentes y sugieren que las cepas de *T. emersonii* producen diferentes niveles de las mismas xilanasas, o expresan diferentes isoformas. Para ilustrar este punto, se realizó tinción de zimograma después de electroforesis en gel SDS-PAGE (renaturalizada como se describe en Tuohy & Coughlan (1992)) e IEF con los filtrados de cultivo de cepa IMI393751 y CBS549.92. Estos estudios confirmaron que (i) se expresan diferentes xilanasas y (ii) el número de isoformas de xilanasas expresadas es notablemente diferente. Los resultados obtenidos para expresión de xilanasas en algarroba se resumen como sigue: isoformas de xilanasas detectadas (véase Tuohy y col., (1994) para referencia a pl y Mr de las isoformas) **IMI393751**: Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX y Xyn XI, Xyl I (β -xilosidasa) y Xyl II **CBS549.92**: Xyn II, Xyn VII (nota: Xyn VII es idéntica a la secuencia publicada en una patente anterior (Numero de acceso de GenBank AX403831) y cantidades muy bajas de Xyl I (β -xilosidasa).

Además, IMI393751 es la única cepa que produce Xyn XII durante el crecimiento en hojas de té/platos de papel (y en hojas de té solamente).

El patrón de expresión en diferentes fuentes de carbono es diferente

El patrón de expresión de xilanasas en diferentes fuentes de carbono no es equivalente, es decir

IMI393751:

Glucosa como fuente de carbono: Xyn I, Xyn VIII, una cantidad menor de Xyn XI y sin β -xilosidasa
Algarroba: Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX y Xyn XI, Xyl I (β -xilosidasa) y Xyl II
TL/PLP: Xyn III, Xyn V, Xyn IX, Xyn X, Xyn XII, Xyl I y Xyl II

CBS549.92:

Glucosa: niveles bajos de un componente que podría ser equivalente a Xyn IV y sin β -xilosidasa
Algarroba: Xyn II, Xyn VII y cantidades muy bajas de Xyl I (β -xilosidasa).
TL/PLP: proteínas similares a Xyn I, Xyn VII y Xyn IX, algo de Xyl I

Además, se observaron otros ejemplos claros de diferencias de expresión, por ejemplo, expresión de Xyl I. No se expresa Xyl por IMI393751, CBS549.92, CBS180.68, CBS393.64, CBS394.64 o CBS397.64 durante el crecimiento en glucosa. Por el contrario, en condiciones idénticas, Xyl se expresa por CBS355.92, CBS395.64, CBS472.92 y CBS759.71.

- 5 De forma similar en algarroba, Xyl se expresa por todas las cepas, aunque a niveles notablemente diferentes, con la excepción de CBS394.64. Xyl también se expresa por todas las cepas, excepto CBS180.68 y CBS394.64 durante el crecimiento en TL/PPL. Con OSX como fuente de carbono, Xyl no se expresó por CBS 180.68 y CBS394.64, pero se expresó por CBS393.64 (bajos niveles) y todas las otras cepas. En general se observaron diferencias notables en los niveles de expresión de Xyl I y el patrón de expresión (es decir, las cepas que expresaban las cantidades mayores o menores de Xyl I) entre todos los sustratos inductores.

Diferencias de actividad específica de homólogos producidos por diferentes cepas.

- 15 Las diferentes cepas se compararon con respecto a la expresión de xilanasas clave como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, además las xilanasas presentes en cultivos inducidos de IMI393751 y CBS549.92 se fraccionaron y se comparó la actividad específica de los componentes de xilanasas purificados. En el primer caso, solamente IMI393751 parece producir Xyn XII. Además, cuando se compararon las actividades específicas (se presentan resultados para OSX como sustrato de ensayo posteriormente), se observaron claramente algunas diferencias de actividad específica de enzimas individuales (**Figura 18**).

Producción de nuevos componentes por *T. emersonii* IMI393751 durante el crecimiento en diferentes fuentes de carbono

- 20 Se cultivó *T. emersonii* IMI393751 en una serie de fuentes de carbono y se realizó su perfil mediante SDS-PAGE renaturalizante e IEF, seguido de tinción de zimograma, como se ha presentado anteriormente. Los siguientes son una muestra de algunos de los resultados obtenidos:

- (i) **Hojas de té** como inductor: Xyn III, Xyn V, Xyn IX, algo de Xyn X y Xyn XII; Xyl I y Xyl II
 (ii) **Algarroba**: Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX y Xyn XI, Xyl I (β -xilosidasa) y Xyl II
 25 (iii) **Copos de centeno**: Xyn IV, Xyn V, Xyn VI, Xyn IX, con un nuevo componente de "xilanasas" de pl 6,5; Xyl I (β -xilosidasa) y Xyl II
 (iv) **Harina de venta**: Xyn III, Xyn VI, Xyn VIII, Xyn IX, Xyn X, Xyl I (β -xilosidasa) y Xyl II, con un nuevo componente de "xilanasas" adicional de pl 5.8
 (v) **Sorgo**: Xyn I, Xyn VIII, Xyn IX, Xyn X, Xyn XI, algo de Xyl I (β -xilosidasa) y Xyl II
 30 (vi) **Xilosa**: Xyn I y Xyn VIII, Xyl I
 (vii) **Glucosa**: Xyn I, Xyn VIII, una cantidad menor de Xyn XI y sin β -xilosidasa

Ejemplo 19: Expresión diferencial de otras enzimas adyuvantes por cepas de *T. emersonii*, glutatión peroxidasa

- 35 Se procesaron muestras de filtrado de cultivo (muestras no concentradas y concentradas) en geles de PAGE nativos 7,5%, empapados en glutatión reducido a 50 °C, seguido de incubación con H₂O₂ 0,002%. El gel se tiñó después con cloruro férrico 1%/ferrocianuro potásico 1%. La tinción de zimograma también se complementó por ensayos de enzimas en los filtrados de cultivo.

- 40 IMI393751 produce glutatión peroxidasa extracelular (M_r ~45 kDa), observándose expresión diferencial en varios inductores de carbono (los números 1-18 representan diferentes inductores). Por el contrario no se observó actividad extracelular para ninguna de las otras cepas de *T. emersonii*, incluso en las muestras concentradas. La cepa IMI393751 también produce niveles significativos de glutatión peroxidasa extracelular durante el crecimiento en TLIPPL.

Catalasa

- 45 Se procesaron muestras de filtrado de cultivo (muestras no concentradas y concentradas) en geles de PAGE nativo 7,5%, seguido de incubación con H₂O₂ 3%. El gel se tiñó después con cloruro férrico 1%/ferrocianuro potásico 1% (aparecen bandas de catalasa como bandas amarillas intensas). La tinción de zimograma también se complementó por ensayos de enzima en los filtrados de cultivo, usando el procedimiento publicado convencional.

- 50 IMI393751 produce catalasa extracelular (M_r ~230 kDa), observándose expresión diferencial en varios inductores de carbono (los números 1-18 representan diferentes inductores). Por el contrario no se observó actividad extracelular para ninguna de las otras cepas de *T. emersonii*, incluso en las muestras concentradas.

La presencia de estas actividades enzimáticas en los filtrados de cultivo de IMI393751 sería importante potencialmente al afectar a la estructura del sustrato, pero también al retirar cualquier compuesto que pudiera oxidar actividades hidrolasa clave, por ejemplo, xilanasas o glucanasas.

Ejemplo 20: Comparación de fenotipo de 10 cepas de *T. emersonii* en diferentes medios sólidos (agar)

B. Medios de agar

1. Agar de dextrosa Sabouraud (Oxoid Ltd., Reino Unido)
2. Agar de maltosa de patata (Oxoid Ltd., Reino Unido)
3. Czapek Dox (Oxoid Ltd., Reino Unido; pH no ajustado)
4. Agar de harina de maíz (Oxoid Ltd., Reino Unido)
5. Agar de extracto de malta (Oxoid Ltd., Reino Unido)
6. Agar nutriente (Difco Ltd., Reino Unido)
7. Agar de Emerson (almidón soluble en potasio de levadura; YpSs)

Se añadieron los siguientes ingredientes a 1 l de H₂O destilada

- 15,0 g de almidón soluble (Sigma-Aldrich, Dublín, Irlanda)
- 4,0 g de extracto de levadura (Oxoid Ltd., Reino Unido)
- 1,0 g de *di*-hidrógeno fosfato potásico (KH₂PO₄)
- 0,5 g de sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO₄·7H₂O)
- 20,0 g de agar N° 1 (Oxoid Ltd., Reino Unido)

8. Agar de glucosa de levadura (YGA)

Se añadieron los siguientes ingredientes a 1 l de H₂O destilada

- 20,0 g de glucosa (Sigma-Aldrich, Dublín, Irlanda)
- 10,0 g de extracto de levadura (Oxoid Ltd., Reino Unido)
- 15,0 g de agar N° 1 (Oxoid Ltd., Reino Unido)

Se inocularon placas de agar (cada tipo de agar) con las 10 cepas de *T. emersonii* diferentes. Se incubó un lote de placas a 45 °C y el segundo a 55 °C (el contenido de humedad del aire fue de ~20-30%). Los cultivos se comprobaron diariamente, y se registraron los siguientes resultados:

- (a) medición de diámetro de cultivo (usando unos calibradores)
- (b) registro fotográfico usando una cámara digital de 7,0 M píxeles
- (c) registro de diferencias/cambios fenotípicos visibles
- (d) indicios de formación de esporas (análisis microscópico) u otros

Resultados:

El cultivo de las cepas de *T. emersonii* en los diferentes medios de agar reveló claras diferencias entre la cepa 393751 y las otras 9 cepas con respecto a lo siguiente:

Tablas 43 y 44 Sumario de la velocidad y alcance del crecimiento a 45 °C - mediciones de diámetro de cultivo tomadas el día 2 y el día 5

Tabla 45: Velocidad de crecimiento a 55 °C - mediciones de diámetro de cultivo tomadas el día 5

Tabla 46: Sumario de cambios fenotípicos visibles y pruebas de formación de esporas.

Observación importante 1: muchas de las cepas de IMI/CBS produjeron cultivos de múltiples colores. Sin embargo, se verificó la pureza de estos cultivos. Los colores/pigmentos producidos y el patrón de producción es típico de muchas especies de *Penicillium*, por ejemplo, *P. pinophilum*.

Observación importante 2: Como se indica en la Tabla 20, existen claras diferencias entre la cepa 393751 y la otra con respecto a formación de esporas.

Tabla 43: Velocidad y alcance de crecimiento a 45 °C – Mediciones de diámetro de cultivo tomadas el día 5

Cepa	ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar Nutr	Czapek Dox	AHA
IMI 393751 (la cepa de los inventores)	+++++	+++++	++	+++++	++	+++++	++	+++++	+++++
IMI393752 (CBS 549.92)	+++++	+++++	++	+++	++	++++	++	+++	+++++

ES 2 393 930 T3

(continuación)

Cepa	ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar Nutr	Czapek Dox	AHA
IMI393753 (CBS 180.68)	+++	++++	+	+++	+	++++	++	+++	+++
IMI393755 (CBS 355.92)	++++	+++++	++	++++	+	++++	+	++	++++
IMI393756 (CBS 393.64)	++++	+++++	+++	++++	++	++++	++	+++	++++
IMI393757 (CBS 394.64)	+++	+++	+	++++	+	+++	+	++	+++
IMI393758 (CBS 395.64)	+++++	+++++	++	+++	+	++++	+++	++	++++
IMI393759 (CBS 397.64)	+++++	+++++	++	+++	++	+++++	++	+++	++++
IMI393760 (CBS 472.92)	+++++	+++++	++++	+++++	++	++++	++	+++	+++++
IMI393761 (CBS 759.71)	+++++	+++++	nd	++++	++	+++	++	++	++++
ADS, Agar de dextrosa Sabouraud; AHM, agar de harina de maíz; AMP, agar de maltosa de patata; AEM, agar de extracto de malta; YpSs, almidón soluble en potasio de levadura; YG, agar de glucosa de levadura; AN, agar nutritivo; AHA, agar de harina de avena. Diámetros del cultivo: placa completa, ++++++; 65-80 mm, ++++++; 50-65 mm, ++++; 35-50 mm, +++; 20-35 mm, ++; y <20 mm, +.									

Tabla 44: Velocidad y alcance del crecimiento a 45 °C – mediciones del diámetro de cultivo tomadas el día 2

Cepa	ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar nutr	Czapek Dox	AHA
IMI 393751 (la cepa de los inventores)	++++	++	+	++++	+	+++	+	+++	++++
IMI393752 (CBS 549.92)	+++	+++	+	+	+	++	+	+	+++
IMI393753 (CBS 180.68)	++	++	-	+	+	++	+	+	+
IMI393755 (CBS 355.92)	++	++	+	++	-	+	-	-	+
IMI393756 (CBS 393.64)	++	+	+	+	+	++	-	+	+
IMI393757 (CBS 394.64)	+	+	-	++	-	+	-	+	+
IMI393758 (CBS 395.64)	++	++	+	+	-	+	+	+	++
IMI393759 (CBS 397.64)	++	++	+	+	+	+	+	+	+
IMI393760 (CBS 472.92)	++	++	++	++	+	++	-	+	+++
IMI393761 (CBS 759.711)	++	++	nd	+	+/-	+	+/-	+	+
ADS, Agar de dextrosa Sabouraud; AHM, agar de harina de maíz; AMP, agar de maltosa de patata; AEM, agar de extracto de malta; YpSs, almidón soluble en potasio de levadura; YG, agar de glucosa de levadura; AN, agar nutriente; AHA, agar de harina de avena. Diámetros del cultivo: placa completa, ++++++; 65-80 mm, +++++; 50-65 mm, ++++; 35-50 mm, +++; 20-35 mm, ++; y <20 mm, +; sin pruebas de crecimiento, -.									

Tabla 45: Velocidad de alcance de crecimiento a 55 °C – mediciones de diámetro de cultivo tomadas el día 5

Cepa	ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar nutr	Czapek Dox	AHA
IMI 393751 (la cepa de los inventores)	++++++	+++++	++	++++++	+++	++++++	++	++++++	++++++
IMI393752 (CBS 549.92)	++	++	+	+	+	++	+	+	+++
IMI393753 (CBS 180.68)	+	+	-	+	-	+	-	+	+
IMI393755 (CBS 355.92)	+	++	+/-	+	-	+	-	-	++
IMI393756 (CBS 393.64)	+	++	+	-	-	+/-	-	-	+
IMI393757 (CBS 394.64)	+	+	-	+	-	+	-	-	+/-
IMI393758 (CBS 395.64)	+++	+++	+	+++	+	++	+	+	+++
IMI393759 (CBS 397.64)	+	-	-	-	-	++	-	+/-	+/-
IMI393760 (CBS 472.92)	+	++	++	++	-	+/-	-	-	++

ES 2 393 930 T3

(continuación)

Cepa	ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar nutr	Czapek Dox	AHA
IMI393761 (CBS 759.71)	+	-	-	+/-	-	+/-	-	-	+
ADS, Agar de dextrosa Sabouraud; AHM, agar de harina de maíz; AMP, agar de maltosa de patata; AEM, agar de extracto de malta; YpSs, almidón soluble en potasio de levadura; YG, agar de glucosa de levadura; AN, agar nutriente; AHA, agar de harina de avena. Diámetros del cultivo: placa completa, ++++++; 65-80 mm, +++++; 50-65 mm, ++++; 35-50 mm, +++; 20-35 mm, ++; y <20 mm, +; sin pruebas de crecimiento, -.									

Tabla 46: Sumario de cambios fenotípicos visibles y pruebas de formación de esporas (cultivos de 5 días de edad, 45 °C).

Cepa	ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar nutr	Czapek Dox	AHA
IMI 393751 (la cepa de los inventores)	Crecimiento muy denso, esponjoso, blanco cremoso; color naranja en el centro	Crecimiento ligero, translúcido; crecimiento denso en el punto de inoculación	Apariencia de color ante y esponjosa;	Crecimiento blanco esponjoso; color ante en el borde de ataque	Centro de ante oscuro; crecimiento denso más claro en el borde de ataque	Centro de ante oscuro; crecimiento denso más claro en el borde de ataque	Crecimiento translúcido; borde de ataque de ante oscuro	Crecimiento translúcido; apariencia "plumosa"	Blanco y centro de ante
	X	algo	X	X	X	X	X	X	Si
IMI393752 (CBS 549.92)	Blanca/crema; verde lima; ante más oscuro-verde en el centro	Crecimiento translúcido pálido; esporas verdes	Crecimiento denso-centro crema-ante y bordes de ante	Centro crema claro; verde lima	Crema-ante claro	Verde lima; borde de ataque crema	Ante claro; borde de ataque viscoso	Crecimiento translúcido; centro verde	Crecimiento denso verde lima; centro rosado; borde de ataque crema
	Si	Si	X	Si	Algo	Si	X	Si	Si
IMI393753 (CBS 180.68)	Blanco esponjoso con centro de verde a ante oscuro	Crecimiento translúcido crema blanco	Crecimiento muy denso; crema-ante	Crecimiento denso; borde crema, centro amarillo-verde-naranja pálido	Crema-ante	Bordes verdes; centro crema pálido y verde	Denso ante-crema; borde de ataque viscoso	Crecimiento translúcido; centro verde claro	Borde de ataque crema pálido; centro de verde claro a crema oscuro
	Si	Si	Si	Si	Algo	Algo	X	Si	Si

(continuación)

Cepa		ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar nutr	Czapek Dox	AHA
	Apariencia	Centro ante oscuro; borde de ataque crema	Crecimiento translúcido crema	Crecimiento denso; crema-ante	Bordes crema; medio verde lima; centro naranja	Ante-crema	Centro crema-ante oscuro	Ante-crema; borde de ataque viscoso	Crecimiento muy translúcido	Bordes de ante; centro verde claro crema y ante oscuro
IMI393755 (CBS 355.92)										
	Esporulación	Si	Si	Si	Si	Algo	Si	Algo	Algo	Si
	Apariencia	Crecimiento muy denso; crema-ante	Crecimiento claro, translúcido	Ante oscuro	Ante claro-verde claro-naranja y centro crema	Ante, crecimiento denso	Bordes de ante, de verde a verde más oscuro en el centro	Ante-blanco	Crecimiento muy claro y translúcido	Crema en los bordes; centro verde-naranja
IMI393756 (CBS 393.64)										
	Esporulación	Si	Algo	Si	Si	Si	Si	Si	Algo	Si
	Apariencia	Crema en los bordes; centro verde lima-naranja; crecimiento muy denso	Translúcido; verde claro	Ante oscuro; esporangio crema	Cruciforme; bordes verde pálido; centro naranja-ante	Crema	Crecimiento denso verde-ante	Crema-ante; apariencia viscosa	Claro; esporas de ante en los bordes	Bordes verde pálido-crema; centro verde más oscuro
IMI393757 (CBS 394.64)										
	Esporulación	Si	Si	Si	Si	No concluyente	Si	Algo	Algo	Si
	Apariencia	Bordes de ante-blanco; centro más oscuro	Escaso crecimiento; translúcido; esporas de ante	Crecimiento denso; crema-verde	Crecimiento denso, esponjoso; ante-verde	Ante-crema; crecimiento muy escaso	Bordes de ante; esporas verdes	Ante-un poco blanco; viscoso	Muy claro y translúcido; muy escaso	Crecimiento denso; centro crema-ante
IMI393758 (CBS 395.64)										

(continuación)

Cepa	Esporulación	ADS	AHM	AMP	AEM	YpSs	YG	Agar nutr	Czapek Dox	AHA
		Si	Si	Si	Si (amarillo)	Si	Si	Algo	No concluyente	Si
	Apariencia	Bordes blancos, verde-ante en el centro	Translúcido; esporas blancas	Ante denso	Borde crema; centro verde-naranja	Crecimiento escaso; centro de ante, blanco	Bordes verde-ante; centro denso verde-ante	Escaso crecimiento; ante, viscoso en los bordes	Muy claro y translúcido; ante pálido	Bordes blancos amarillo-verde
IMI393759 (CBS 397.64)										
	Esporulación	Si	Si	No concluyente	Si	No concluyente	Si	No concluyente	Si	Si
	Apariencia	Centro denso ocre-ante-verde lima	Blanco; crecimiento ligero	Blanco	Bordes pálidos, centro verde fluorescente	Blanco pálido-crema	Centro denso-verde oscuro; bordes de ante	Ante, apariencia viscosa	Translúcido; algunas esporas blancas	Translúcido y ante
IMI393760 (CBS 472.92)										
	Esporulación	Si	Si	Si	Si	Algo	Si	No concluyente	Algo	Si
	Apariencia	Bordes de ante oscuro; crema pálido-verde lima-ocre	Crecimiento escaso-matiz verde pálido	nd	Bordes blancos, centro amarillo-ocre oscuro-ante oscuro	De blanco a pálido en los bordes	Crecimiento denso crema-ante	Crema-ante, apariencia viscosa	Crecimiento escaso; esporas blancas	Crema en los bordes, interior de verde lima pálido a verde
IMI393760 (CBS 472.92)										
	Esporulación	Si	Si		Si	No concluyente	No concluyente	No concluyente	Si	Si
ADS, agar dextrosa Sabouraud; AHM, agar de harina de maíz; AMP, agar de maltosa de patata; AEM, agar de extracto de malta; YpSs, almidón soluble en potasio de levadura, YG, agar de glucosa de levadura; AN, agar nutriente; AHA, agar de harina de avena										

Ejemplo 20: Reducción del volumen y aumento del valor calorífico de los flujos de residuos antes de la incineración**Residuos clínicos esterilizados ricos en celulosa**

Los residuos clínicos tienen un valor calorífico de ~14 GJ/tonelada. En esta forma, contienen ~50-55% de material rico en celulosa, que tiene una alta capacidad de unión a agua y menor valor calorífico en comparación con plásticos presentes en el flujo de residuos. El tratamiento del componente rico en celulosa de estos residuos usando los cócteles de enzimas termoestables de la invención, por ejemplo, cócteles 5 y 8, puede reducir el volumen de residuos en ~73-8% y convertir la celulosa presente (conversión del 79-84%) y generar ~2,25-2,61 GJ/tonelada (valor calorífico). El resto, que está enriquecido en plásticos podría usarse como un combustible derivado de desechos "seleccionados" con un valor calorífico potencial de hasta 34-38 GJ/tonelada.

Fracción orgánica de residuos sólidos municipales

La fracción orgánica de los residuos sólidos municipales tiene un poder calorífico de ~9,2-10,2 GJ/tonelada. En esta forma, contiene ~50-65% de material rico en carbohidratos (principalmente de residuos de alimentos y papel), que tiene una alta capacidad de unión a agua y menor valor calorífico en comparación con otros componentes, por ejemplo, poliestireno, plásticos y goma presentes en el flujo de residuos. El tratamiento del componente rico en celulosa de este residuo con los cócteles de enzimas termoestables de la invención puede reducir el volumen de residuos en ~50-70% y convertir el carbohidrato presente (conversión del 71-91%) y generar ~3,8-7,8 GJ/tonelada (valor calorífico). El resto, que está enriquecido en componentes no biodegradables (por ejemplo, poliestireno, plásticos y goma), podría usarse como un combustible derivado de desechos "seleccionados" con un valor calorífico potencial de hasta 26-38 GJ/tonelada.

Es por lo tanto posible tratar los residuos municipales y otras formas de residuos antes de su incineración. Tratando de este modo tales materias primas se puede reducir, aumentar o alterar su valor calorífico. Por lo tanto, cuando un tratamiento produce una mezcla de azúcares líquida o lixiviado que se recoge o retira sería posible reducir el valor calorífico. La alteración del valor calorífico podría facilitar la incineración de tales materias primas: por ejemplo, reduciendo el valor calorífico a un nivel "establecido" sería más fácil controlar el procedimiento de incineración; aumentando el valor calorífico (es decir, tratar los azúcares presentes como azúcares sencillos en la materia prima tratada) el valor calorífico podría aumentarse lo que significa que se reduce la cantidad de energía requerida para la incineración en sí misma. Por ejemplo, convirtiendo la celulosa presente en el flujo de residuos clínicos ricos en celulosa en azúcares sencillos y retirando éstos, el valor calorífico del resto sería bastante bajo ya que contendría principalmente plásticos, algunos metales, etc. La conversión enzimática de carbohidratos complejos en residuos de papel a azúcares sencillos y recuperación de los azúcares sencillos reduciría significativamente el valor calorífico de los residuos, el resto aún tendría valor calorífico, pero éste sería mucho menor (y dependería mucho del contenido de lignina).

Por lo tanto en un aspecto adicional la invención proporciona un procedimiento para alterar el valor calorífico de un flujo de residuos tratando el flujo de residuos con una cepa de *Talaromyces emersonii* de la invención o una enzima o composición enzimática de la invención.

Referencias

1. Raeder U. y Broda P. (1985), Lett. Appl. Microbiol. Vol. 1 págs. 17-20.
2. P. Chomozynski y N. Sacchi (1987), Anal. Biochem Vol. 162, 156-159.
3. J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis (1989), "Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
4. G. Zaide, D. Shallom, S. Shulami, G. Zolotnitsky, G. Golan, T. Baasov, G. Shoham y Y. Shoham (2001) Eur. J. Biochem. Vol. 268; 3006-1016.
5. P.G. Murray, C.M. Collins, A. Grassick y M.G. Tuohy (2003), Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 301, 280-286.
6. A.J. Harvey, M. Hrmova, R. De Gori, J.N. Varghese y G.B. Fincher, (2000) Proteins Vol. 41, 257-269.
7. A.P. Moloney, T.J. Hackett, P.J. Considine, M.P. Coughlan, (1983) Enzyme Microb. Technol. Vol. 5, 260-264.
8. G.L. Miller (1951), Anal. Chem. Vol. 31, 426-428.
9. M. Dubois, K. Gilles, P.A. Hamillton, P.A. Rebers, F. Smith, (1956) Anal. Chem. 28, 350-356.
10. U.R. Laemmli, (1970), Nature (Londres), Vol. 227, 680-685.
11. P.G. Murray, A-Grassick, C.D. Laffey, M.M. Cuffe, T. Higgins, A.V. Savage, A. Planas, M.G. Tuohy, (2001), Enzyme Microbial Technol. Vol. 29, 90-98.
12. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951), J. Biol. Chem. 193:265-275.
13. L. Falquet, M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C.J. Sigrist, K. Hofmann, A. Bairoch, (2002). Nucleic Acids Research, Vo. 30, 235-238.
14. H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. on Heigne, (1997), Int. J. Neural Syst., Vol. 8, 581-599.
15. D. Higgins, J. Thompson, T. Gibson (1994): Nucleic Acids Res, Vo. 22. 4673-4680.

16. A.C. Stolk, R.A. Samson (1972) *Studies in Mycology* N° 2, págs. 1-65.
17. Tuohy M.G., Coughlan, M.P. (1992) *Bioresource Technol.* 39, 131-137
18. Tuohy, M.G., Walsh, D.J., Murray, P.G., Claeysens, M., Cuffe, M.M., Savage, A.V., Coughlan, M.P. (2002). *Biochim. Biophys. Acta*, 1596, 336-380.
- 5 19. Reynolds, P.J. (1986) Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Irlanda, Galway.
20. APHA, A., WEF. (1992) *Standard methods for the examination of wastewater*.
21. Walsh, D.J. (1997) Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Irlanda, Galway.
22. Gilleran, C.T. (2004) Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Irlanda, Galway.
23. Maloney, A.P., Callan, S.M., Murray, P.G., Tuohy, M.G. (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 3115-3126.
- 10 24. Braet, C. (2005) Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Galway. Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976). *Anal. Biochem.* 70: 241-250.
25. Tuohy, M.G., Laffey, C.D. & Coughlan. M.P. (1994) *Bioresource Technol.* 50, 37-42. Tuohy, M.G., Puls, J., Claeysens, M. Vrsanska, M. & Coughan. M.P. (1993). *Biochem. J.* 290, 515-523.
26. Murray, P.G., Aro, N., Collins, C., Grassick, A., Penttilä, M., Saloheimo, M. & Tuohy, M. 2004. *Prot. Expr. Purif.* Vol. 38, págs. 248-257.
- 15 27. McCarthy, T., Hanniffy, O., Llor, E., Savage, A.V. & Tuohy, M.G. 2005. *Process Biochem.* Vol. 40, págs. 1741-1748.
28. McCarthy, T., Hanniffy, O., Savage, A.V. & Tuohy, M.G. (2003) *Int. J. Biol. Macromol.* 33: 141-148.
29. Collieran, E. & Pistilli, A. (1994) *Ann. Microbiol. Enzimol.* 44: 1-18.
- 20 30. Coates, J.D., Coughlan, M.F. & Collieran, E. (1996) *J. Microbiol. Meth.* 26: 237-246.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa termófila de *Talaromyces emersonii*, con el N° de depósito IMI 393751 o un mutante de la misma con un intervalo de temperatura de crecimiento de 30 a 90 °C y que secrete de forma activa enzimas a temperaturas por encima de 55 °C.
- 5 2. Uso de una cepa o mutante de acuerdo con la reivindicación 1 para producir una composición enzimática.
3. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para bioconversión de materiales vegetales o derivados de plantas o flujos de residuos incluyendo residuos de hospital.
4. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la producción de materias primas ricas en monosacáridos a partir de restos vegetales.
- 10 5. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el procesamiento y reciclado de productos de papel de madera, papel y textiles.
6. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la sacarificación de residuos de papel.
7. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el control de fangos, antifúngico y biocontrol.
8. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para aplicaciones hortícolas.
- 15 9. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la producción de piensos animales para potenciar la digestibilidad de piensos basados en cereales.
10. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la producción de piensos basados en cereales con bajo contenido en pentosa para animales monogástricos con digestibilidad mejorada y contenidos bajos en β -glucanos no celulósicos.
- 20 11. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la producción de piensos funcionales con potencial bioactivo para su uso en asistencia médica veterinaria.
12. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la producción de productos lácteos o dietéticos especializados, por ejemplo, y formulaciones de alimentos, de bebidas para asistencia médica geriátrica e infantil.
- 25 13. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en los sectores de panadería y confitería, y en la formulación de nuevos productos de panadería de alimentos dietéticos.
14. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la generación de compuestos precursores de sabor, aroma y sensoriales en la industria alimentaria.
15. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para la generación de alimentos funcionales.
- 30 16. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de nuevas bebidas alcohólicas y no alcohólicas de diseño, zumos de frutas y bebidas dietéticas.
17. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en la producción de compuestos biofarmacéuticos, tales como oligosacáridos bioactivos (incluyendo 1,3(4) y 1,3(6)-glucooligosacáridos de enlace mixto, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos, oligosacáridos pépticos, xilooligosacáridos ramificados y lineales, (galacto)glucomanooligosacáridos), glicopéptidos y glicósidos flavonoides de plantas terrestres y marinas, restos vegetales, hongos y flujos de residuos o productos secundarios ricos en azúcares sencillos.
- 35 18. Uso de los microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1, para aumentar la biodisponibilidad de biomoléculas con actividad antibacteriana y antiviral natural, incluyendo glicósidos flavonoides y cianógenos, saponinas, oligosacáridos y fenólicos (incluyendo ácidos ferúlico y *p*-cumárico, epicatequina, catequina, ácido pirogálico y similares).
- 40 19. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para aumentar la biodisponibilidad de biomoléculas antioxidantes naturales, por ejemplo, carotenoides, licopenos, xantofilas, antocianinas, fenólicos y glicósidos de todos los materiales, restos, residuos vegetales, incluyendo diversos frutos y bayas.
20. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para la generación de materias primas a partir de materiales vegetales sin procesar, restos vegetales y residuos para su uso en la producción microbiana de antibióticos por hongos y bacterias, incluyendo *Penicillium sp.* y *Streptomyces sp.*
- 45 21. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para la generación de materias primas a partir de materiales vegetales sin procesar, restos vegetales y residuos para su uso en la producción microbiana de ácido cítrico.

22. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de oligosacáridos a partir de polisacáridos de algas (por ejemplo, laminarano y fucoidano) y aditivos derivados de extractos vegetales, mediante procedimientos generalmente considerados seguros, en la formulación de productos cosméticos.
- 5 23. Uso del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de oligosacáridos y glicopéptidos para su uso como reactivos de investigación, en la producción de biosensores y como herramientas en glicómica funcional para explorar interacciones receptor-ligando y en la producción de bibliotecas de sustratos para realizar perfiles de especificidad de enzima-sustrato.
- 10 24. Uso de la cepa de microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de celulosa y β -glucanos modificados, celooligosacáridos, almidones y maltooligosacáridos modificados, lactulosa y polioles (por ejemplo, manitol, glucitol o dulcitol, xilitol, arabitól).
25. Uso de la cepa de microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en un procedimiento para alterar el valor calorífico de un flujo de residuos.
26. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-25 que comprende además el uso de enzimas derivadas de una o ambas de las cepas *Chaetomium thermophile* y *Thermoascus aurantiacus*.

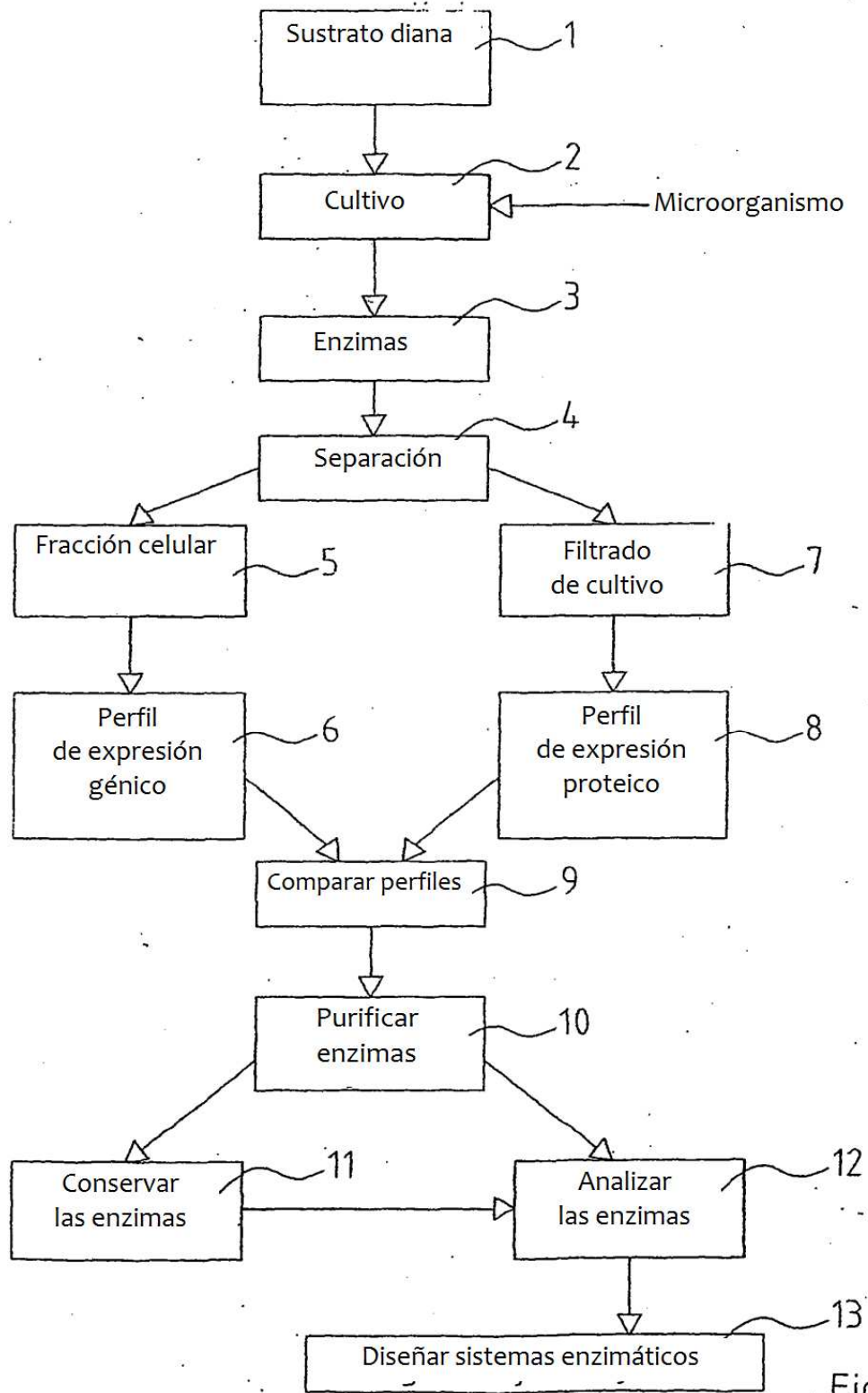


Fig. 1

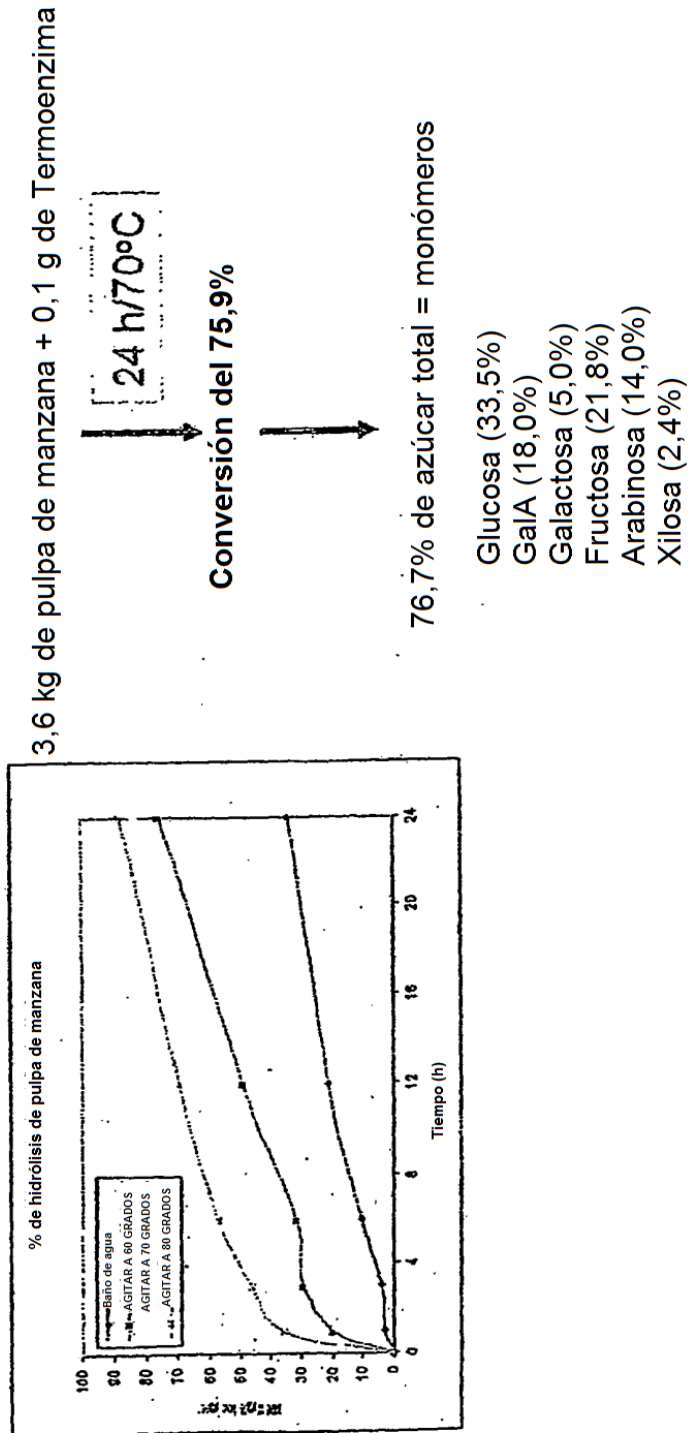
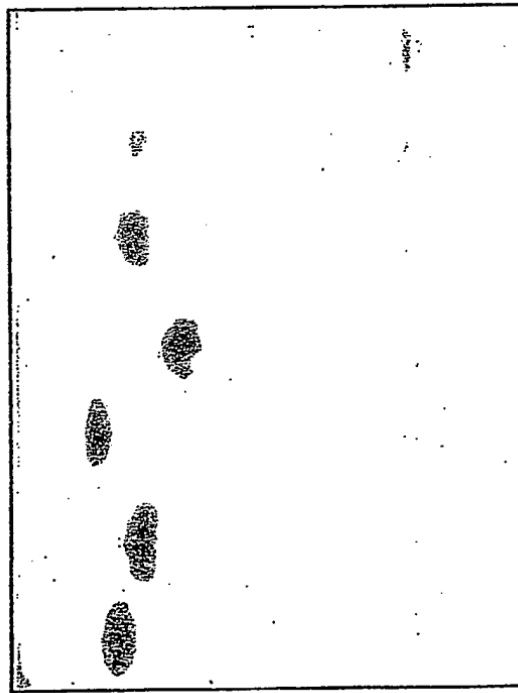
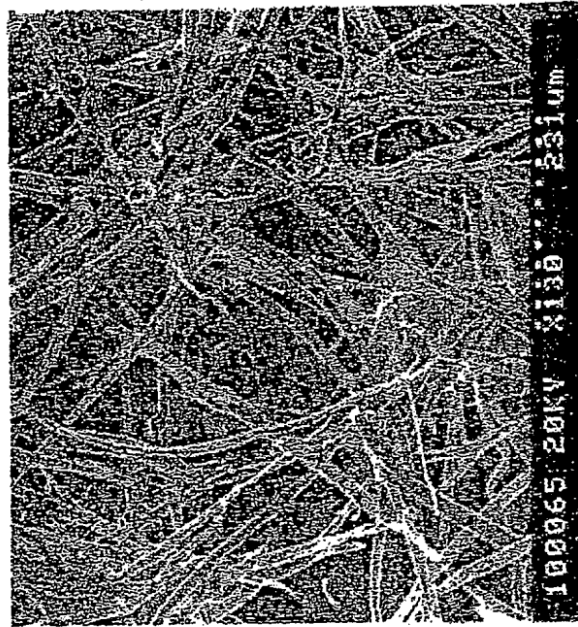


Fig. 2

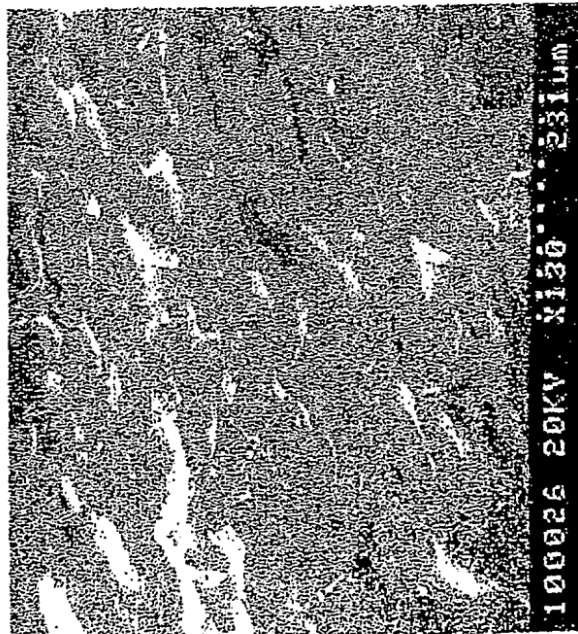


S₁ S₂ S₃ S₄ S₅ T₁ T₂

Fig. 3

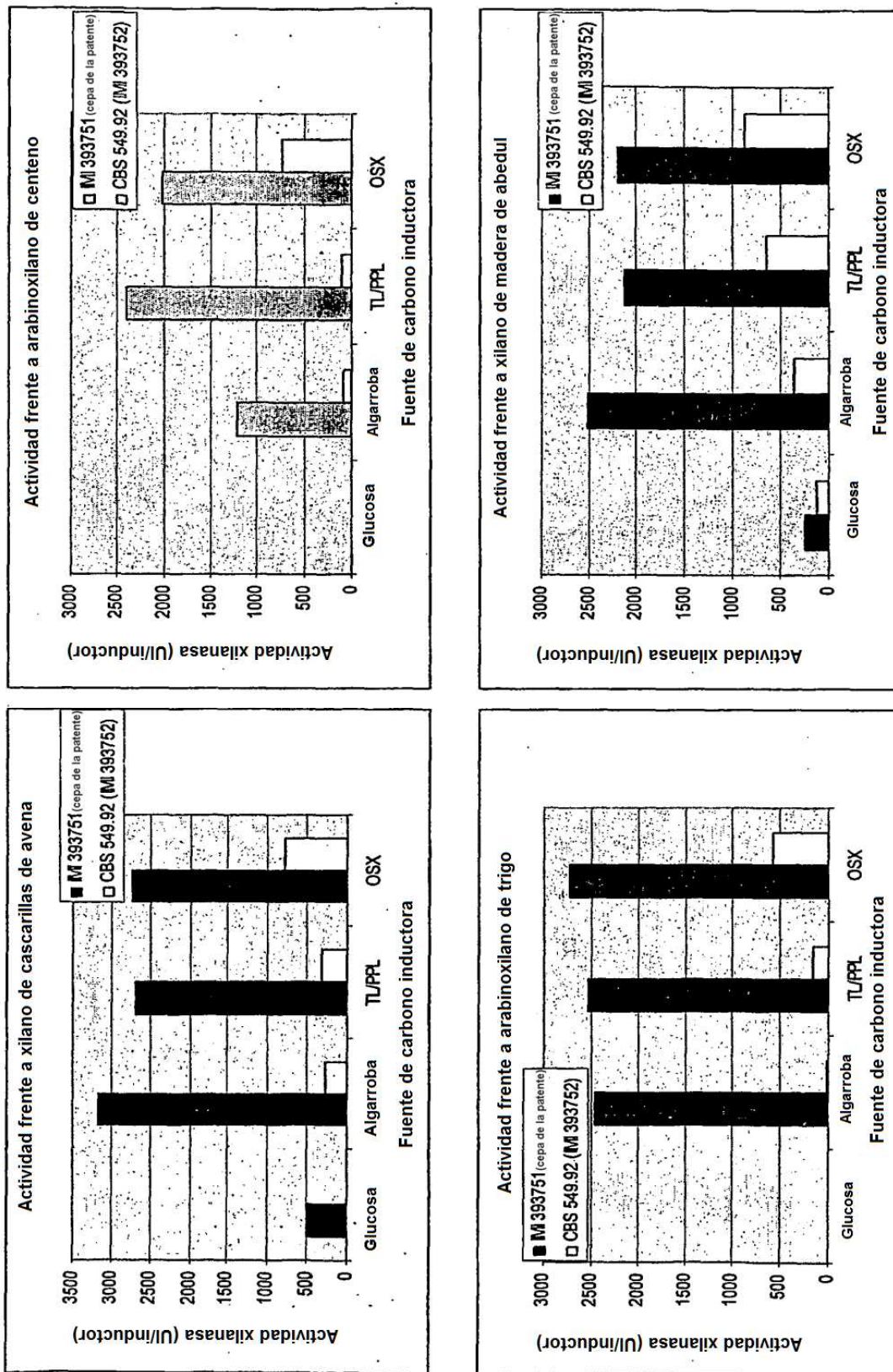


Tiempo = 24 h

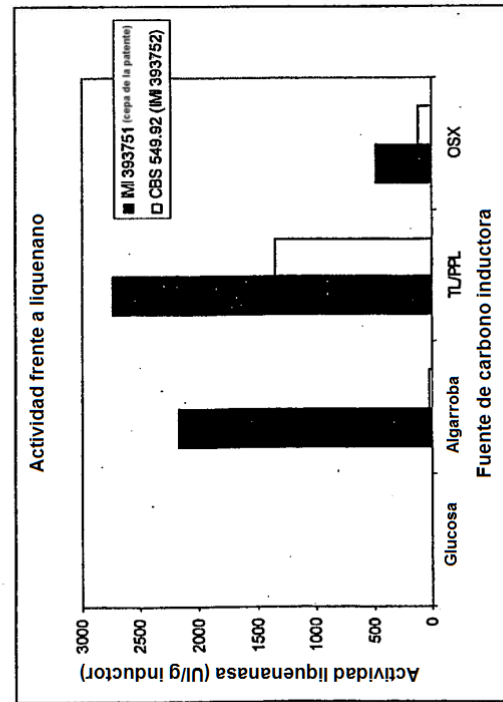
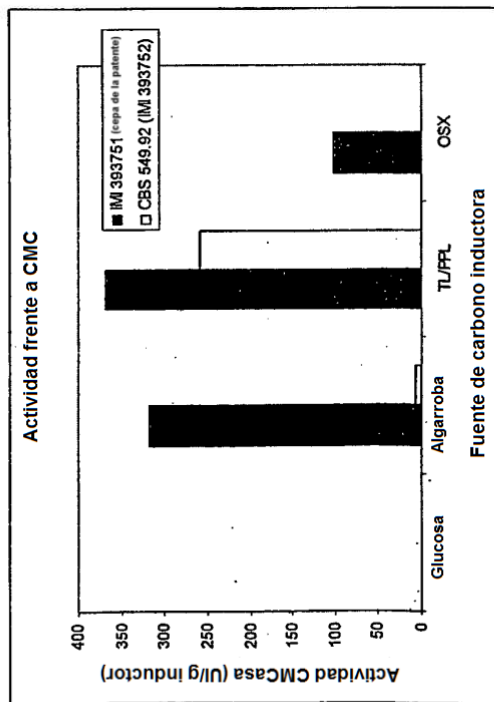
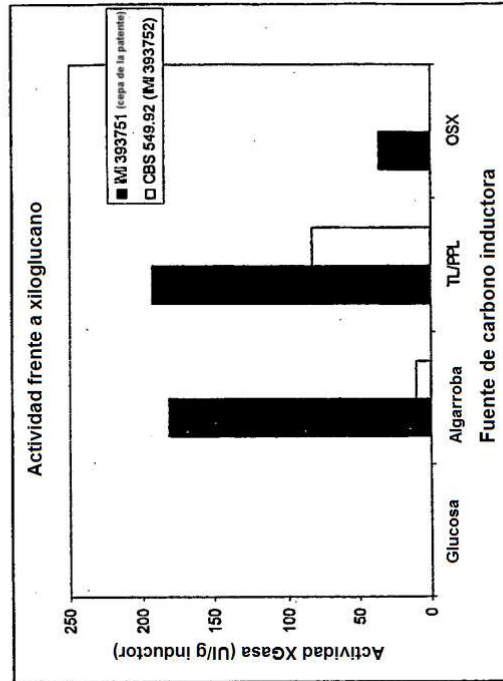
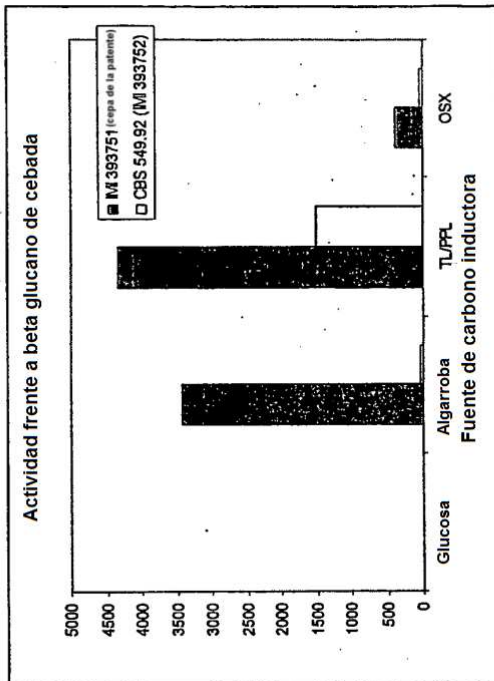


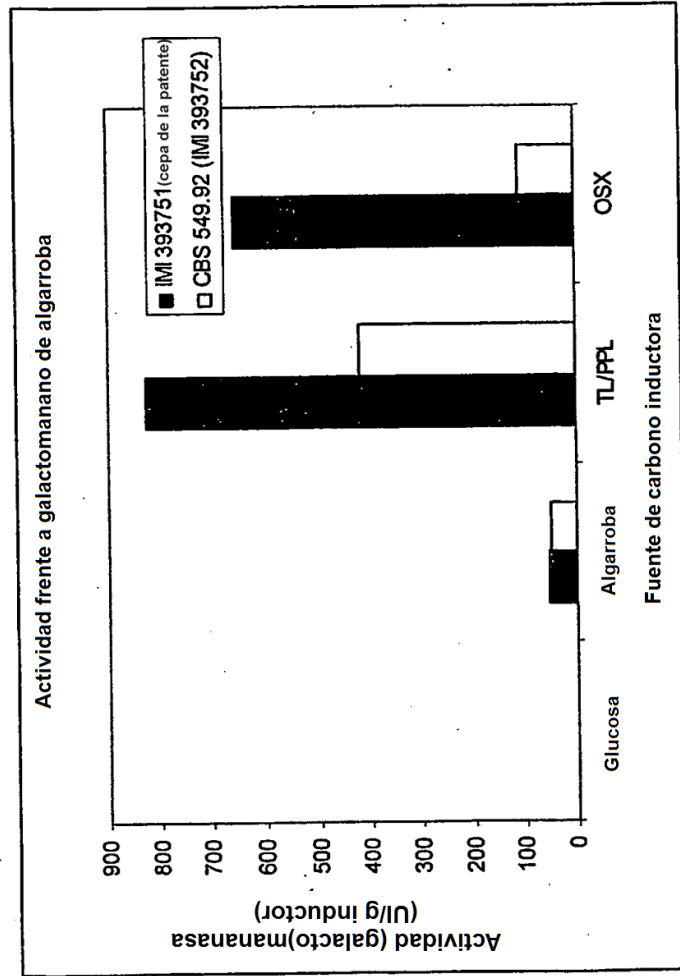
Tiempo = 0 h

Fig. 4



Figuras 5A-D





Figuras 6A-E

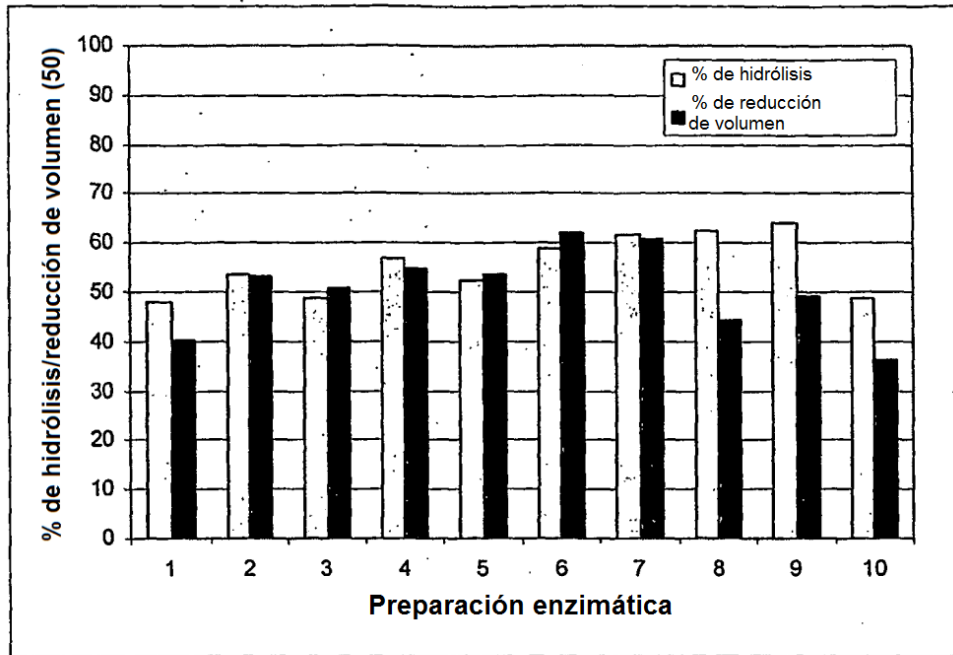


Figura 7

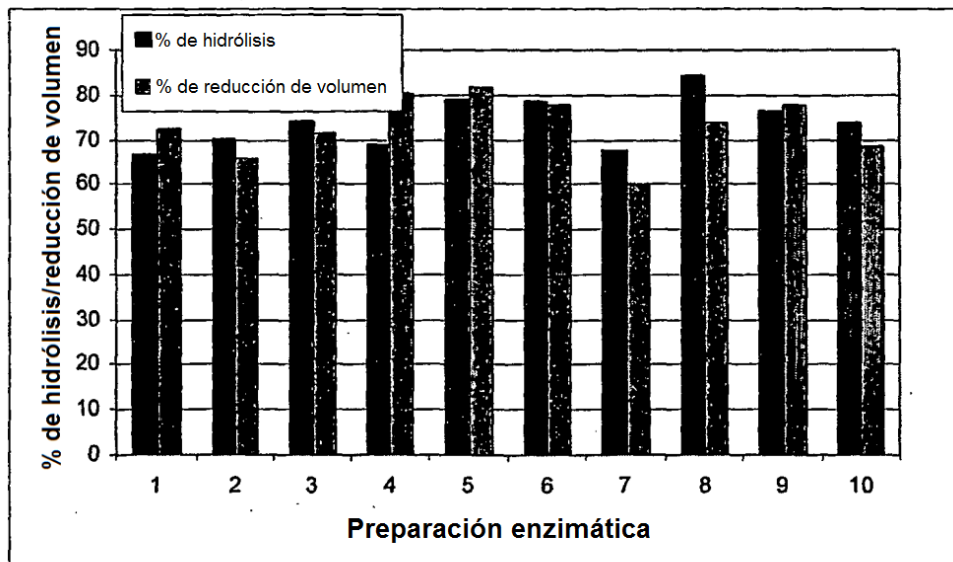


Figura 8

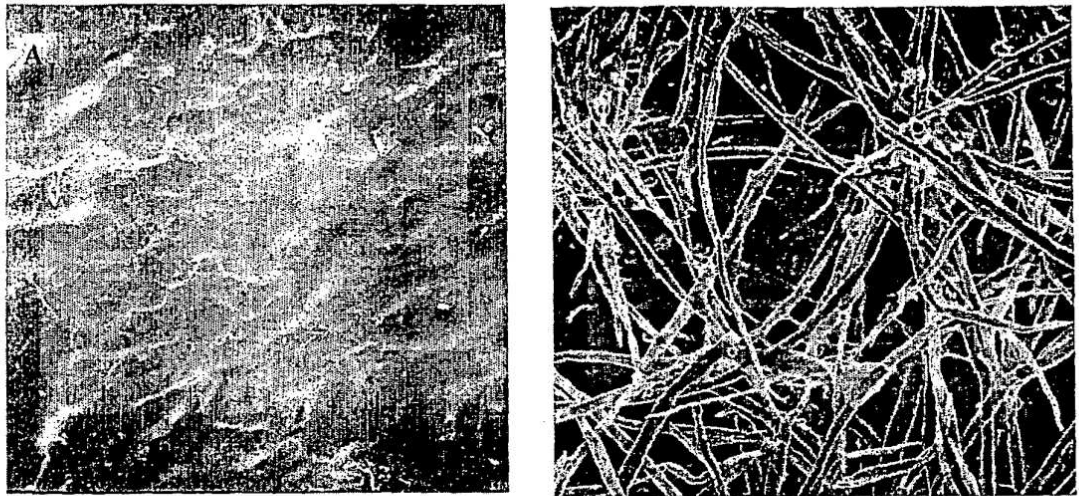
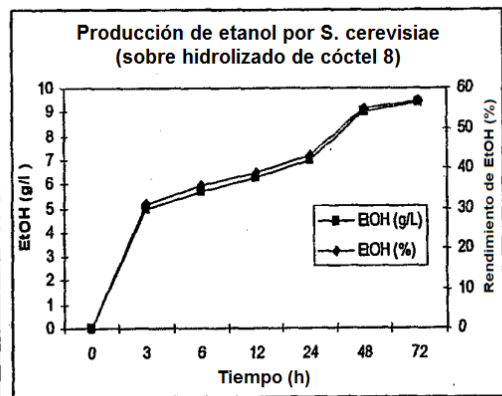
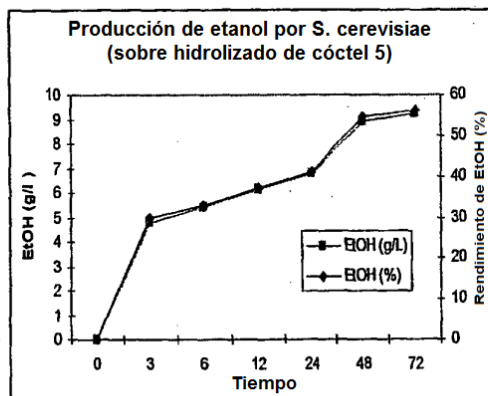


Figura 9A-B:

A

B



Figuras 10A-B:

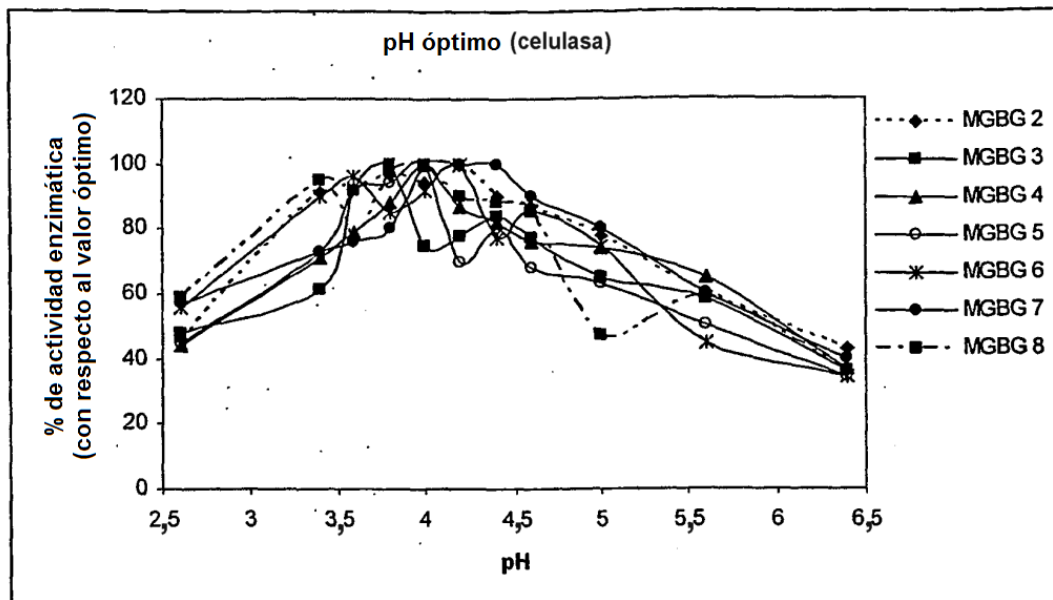


Figura 11A

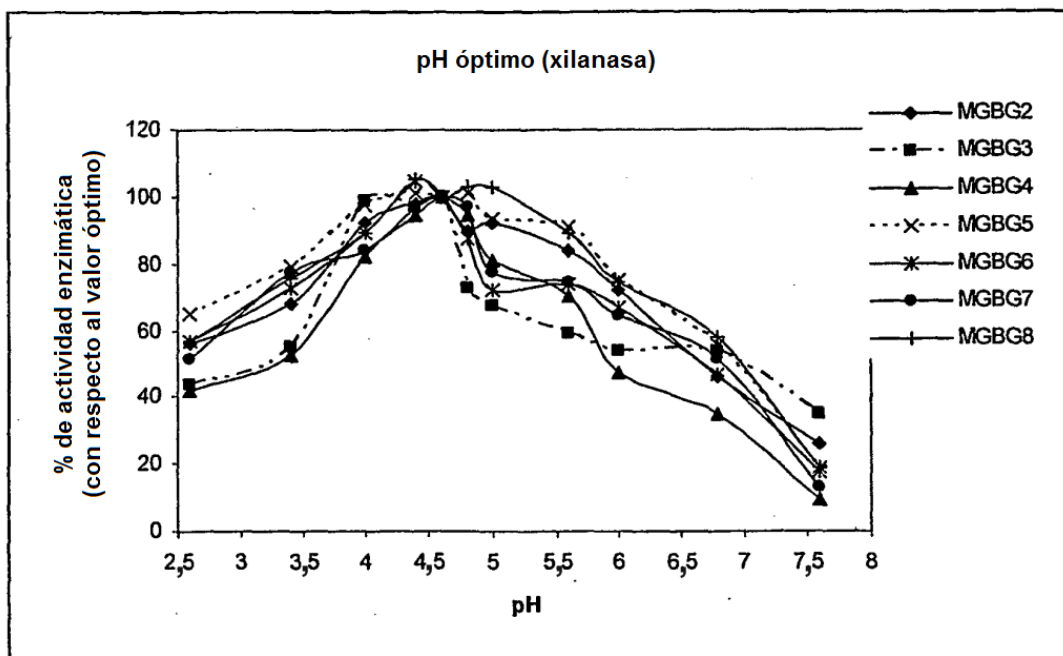


Figura 11B

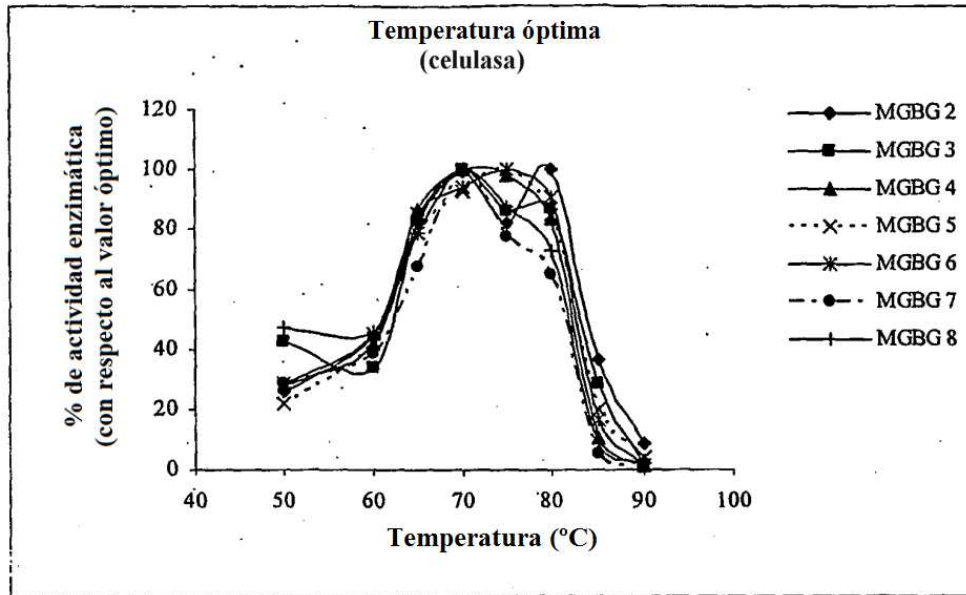


Figura 12

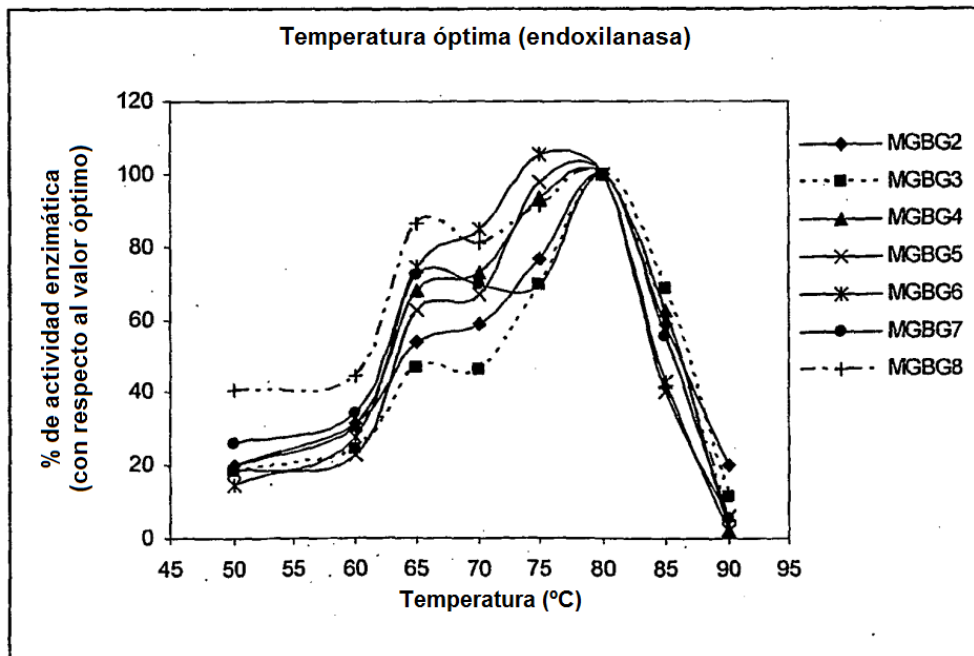


Figura 13

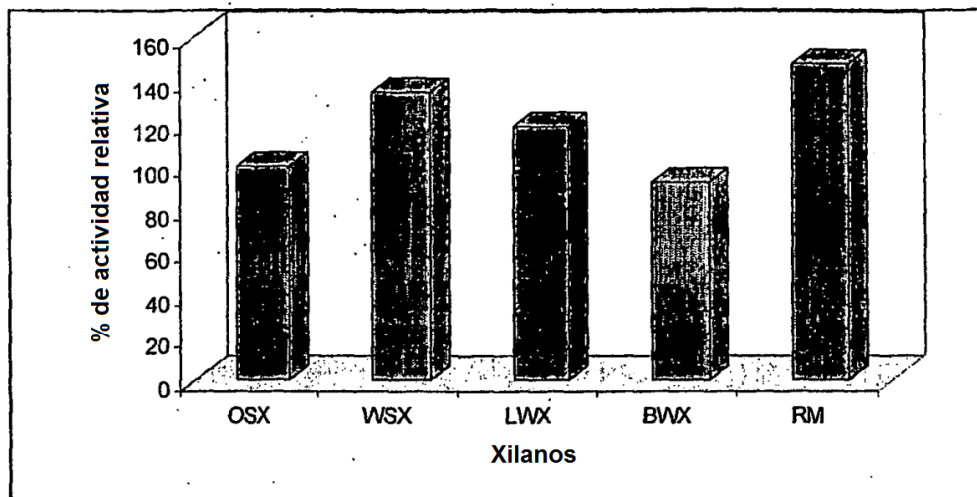


Figura 14

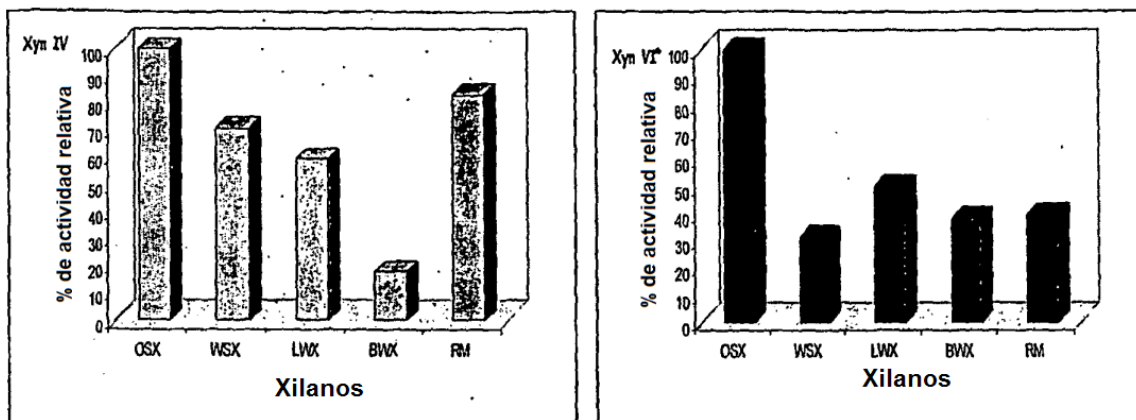


Figura 15A-B:

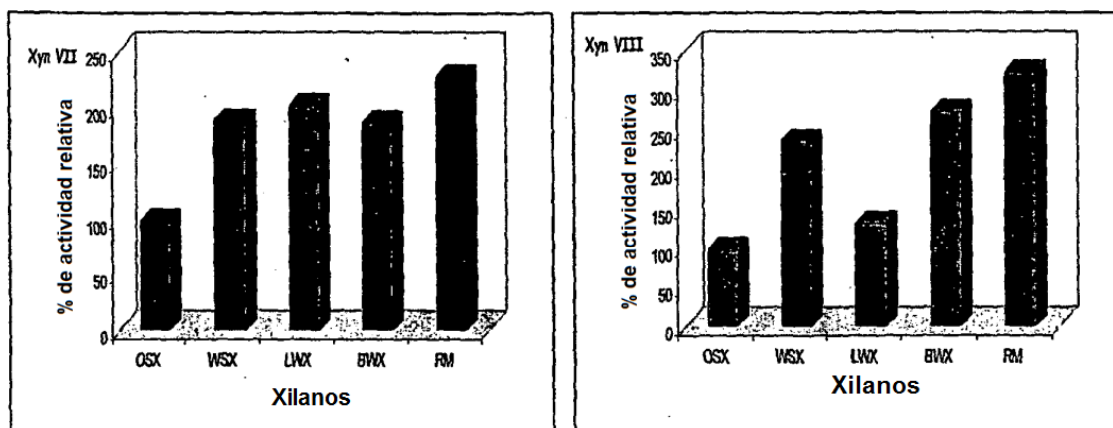


Figura 15C-D:

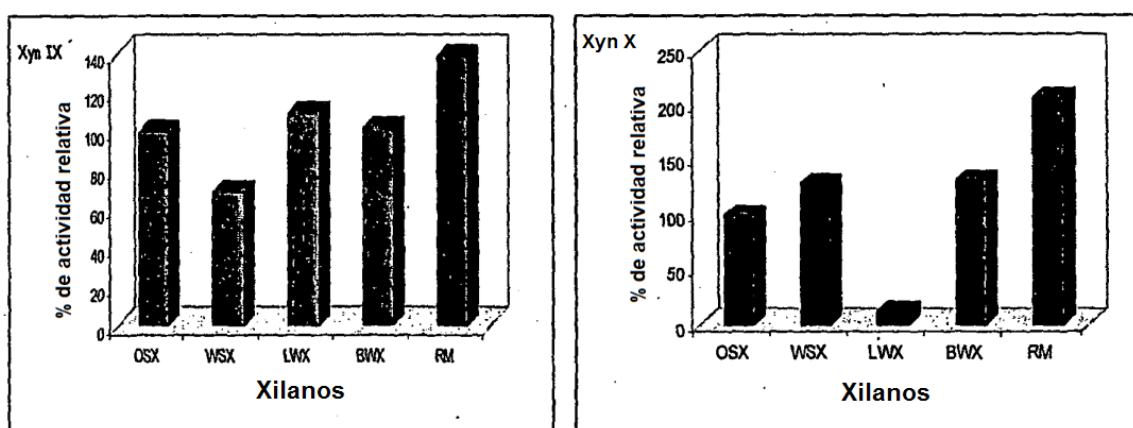


Figura 15E-F:

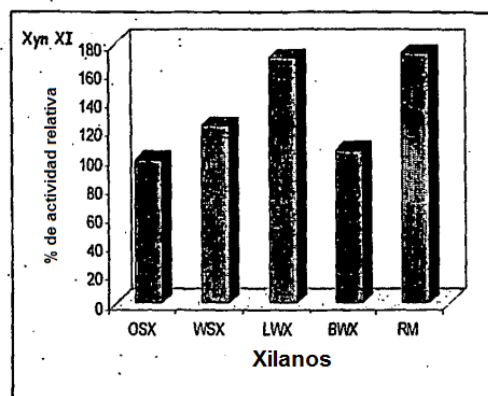


Figura 15G

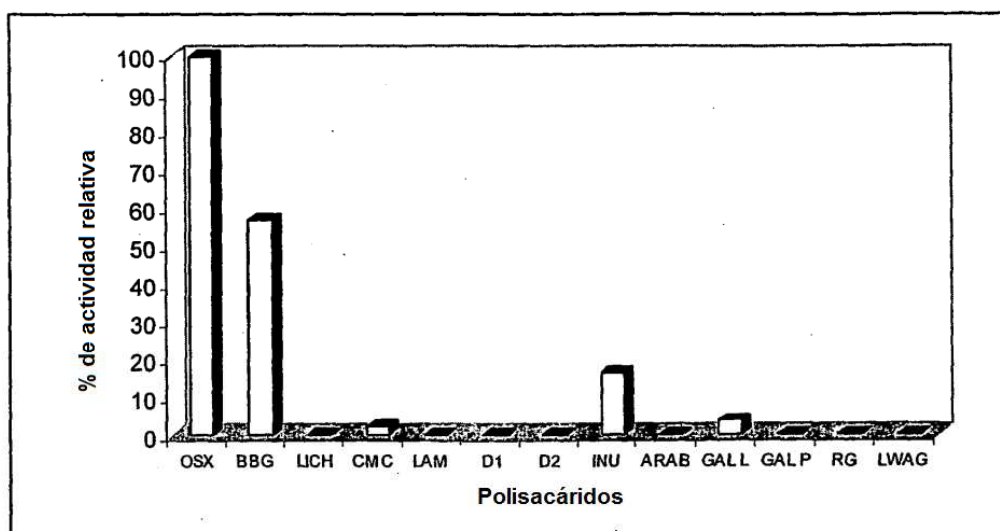


Figura 16

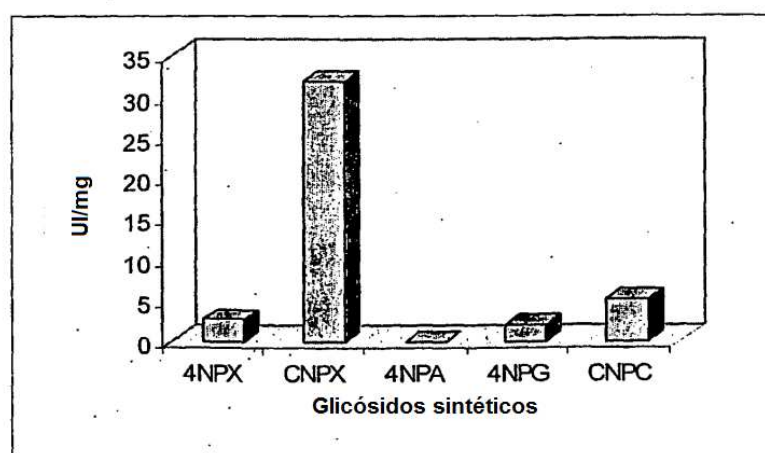


Figura 17

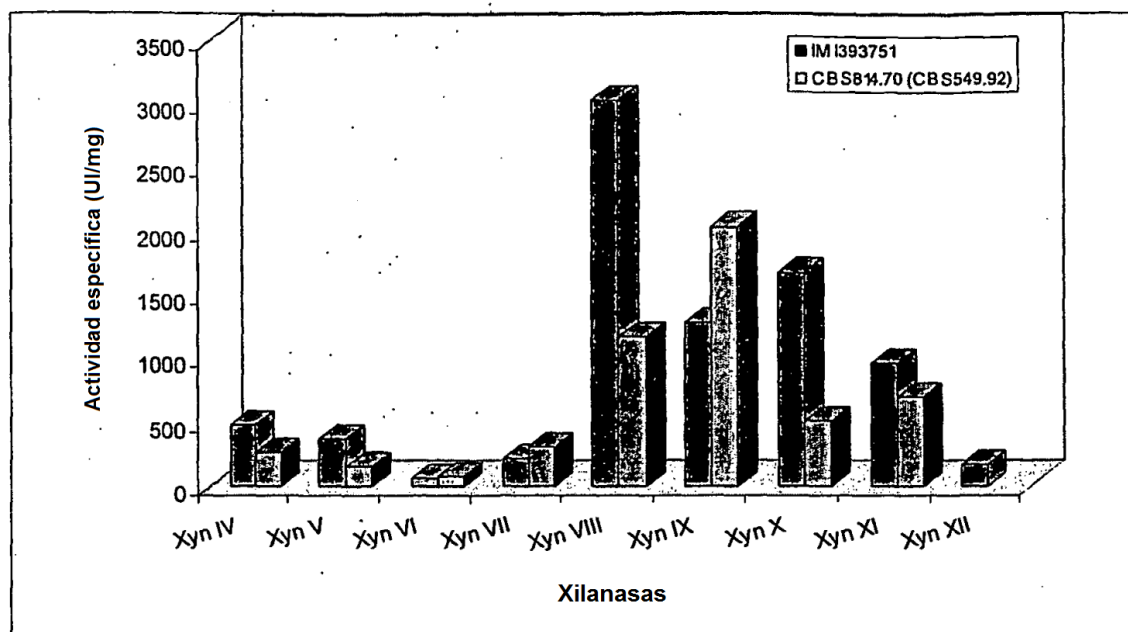


Figura 18