

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 576**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2007 E 07800567 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2076594**

54 Título: **Proceso para hidrólisis enzimática de materias primas lignocelulósicas pretratadas**

30 Prioridad:

31.08.2006 US 841443 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.02.2014

73 Titular/es:

**IOGEN ENERGY CORPORATION (100.0%)
310 HUNT CLUB ROAD EAST
OTTAWA, ONTARIO K1V 1C1, CA**

72 Inventor/es:

**HILL, CHRISTOPHER;
SCOTT, BRIAN R. y
TOMASHEK, JOHN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 441 576 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

Proceso para hidrólisis enzimática de materias primas lignocelulósicas pretratadas

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con una mezcla de enzimas. También se provee un proceso para la hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica, en particular para la hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica pretratada.

Antecedentes de la invención

10 El etanol combustible es producido normalmente a partir de materias primas tales como almidón de maíz, caña de azúcar y remolachas de azúcar. Sin embargo, el potencial para producción de etanol a partir de estas fuentes es limitado puesto que la mayor parte de los terrenos que son adecuados para la producción de estos cultivos ya están en uso para proveer una fuente alimenticia para humanos y animales. Adicionalmente, la producción de etanol a partir de estas materias primas tiene significativas emisiones de gases de invernadero porque se utilizan combustibles fósiles en el proceso de conversión.

15 La producción de etanol, a partir de materias primas que contienen celulosa, tales como residuos agrícolas, pastos y residuos forestales, ha recibido mucha atención en años recientes. Las razones para estos son porque estas materias primas están ampliamente disponibles y no son costosas y su uso para la producción de etanol provee una alternativa a la quema u ocupación de tierras con materiales residuales lignocelulósicos. Además, una porción de la materia prima, la lignina puede ser utilizada como combustible para alimentar el proceso, en vez de combustibles fósiles. Varios estudios han concluido que, cuando se tiene en cuenta el ciclo completo de producción y consumo, el uso de etanol producido a partir de celulosa genera cero gases de invernadero.

20 Las materias primas celulósicas que son las más prometedoras para la producción de etanol incluyen (1) residuos agrícolas tales como leña, espigas de trigo, espigas de cebada, espigas de avena, espigas de arroz, espigas de canola, y espigas de soja; (2) pastos tales como pasto de aguja, miscanthus, pasto de cordón, y pasto rojo canario; (3) residuos de procesos de fibra tales como fibra de maíz, pulpa de remolacha, finos y rechazos de molinos de pulpa y bagazo de caña de azúcar; (4) residuos forestales tales como madera de álamo, otras maderas duras, maderas blandas y aserrín; y (5) productos residuales de papel postconsumo.

25 La etapa de proceso más importante para la conversión de una materia prima lignocelulósica en etanol involucra conversión de celulosa en glucosa, para conversión subsecuente a etanol por fermentación. Los dos procesos primarios para lograr estos son hidrólisis ácida, la cual involucra la hidrólisis de la materia prima utilizando una etapa simple de tratamiento con ácido, e hidrólisis enzimática, la cual involucra un pretratamiento con ácido seguido por hidrólisis con enzimas de celulasa.

30 En el proceso de hidrólisis ácida, la materia prima se somete típicamente a vapor y ácido sulfúrico a una temperatura, concentración de ácido y longitud de tiempo que son suficientes para hidrolizar la celulosa a glucosa y la hemicelulosa a xilosa y a arabinosa. El ácido puede ser concentrado (25-80% p/p) o diluido (3-8% p/p). La glucosa se fermenta entonces a etanol utilizando levadura, y el etanol se recupera y purifica por destilación. Opcionalmente, la glucosa puede ser fermentada a ácido láctico, butanol u otros productos.

35 En el proceso de hidrólisis enzimática, las condiciones de reacción se escogen de tal manera que el área superficial de celulosa se incremente notablemente a medida que la materia prima fibrosa es convertida en una textura lodosa, pero hay poca conversión de la celulosa a glucosa. La celulosa pretratada es hidrolizada entonces a glucosa en una etapa subsecuente que utiliza enzimas de celulasa, y el tratamiento con vapor y/o ácido en este caso se conoce como pretratamiento. La glucosa puede ser fermentada entonces a etanol, ácido láctico, butanol u otros productos. Antes de la adición de la enzima, el pH de la materia prima ácida es ajustado a un valor que sea adecuado para la reacción de hidrólisis enzimática. Típicamente, esto involucra la adición de un álcali a un pH de entre aproximadamente 4 a aproximadamente 6, el cual es el rango de pH óptimo para muchas celulasas, aunque el pH puede ser más alto si se usa celulasas alcalofílicas.

40 En un tipo de proceso de pretratamiento, la presión producida por el vapor disminuye rápidamente con descompresión explosiva, lo que se conoce como explosión de vapor. Foody (Patente de los Estados Unidos No. 4, 461,648) describe el equipo y condiciones usadas en el pretratamiento de explosión de vapor. La explosión de vapor con ácido sulfúrico llevada a cabo a un pH de 0.4 a 2.0 produce material pretratado que es uniforme y requiere menos enzima celulasa para hidrolizar la celulosa que otros procesos de pretratamiento.

50

Las enzimas de celulasa catalizan la hidrólisis de la celulosa (hidrólisis de enlaces fi- 1,4-D-glucano) en la materia prima a producto tales como glucosa, celobiosa y otros celooligosacáridos. La celulasa es un término genérico que denota una mezcla multienzimática que comprende celobiohidrolasas exoactivas (CBH), endoglucanasas (EG) y β -glucosidasas (β G) que pueden ser producidas por un cierto número de plantas y microorganismos. Las enzimas en la celulasa de la *Trichoderma reesei* las cuales contienen un dominio de enlazamiento de la celulosa incluyen CBH1 (más generalmente, Cel7A), CBH2 (Cel6A), EG1 (Cel7B), EG2 (Cel5), EG4 (Cel61A), EG5 (Cel45A), EG6 (Cel74A), Cip1, Cip2, acetil xilan esterasa, β -mananasa, y swolenina. La EG3 (Cel12A) es un ejemplo de una enzima celulolítica sin un dominio de enlazamiento de celulosa.

Las enzimas de celulasa trabajan de manera sinérgica para hidrolizar celulosa a glucosa. La CBH1 y la CBH2 actúan en extremos opuestos de las cadenas de celulosa para liberar celobiosa (Barr et al., 1996), mientras que las endoglucanasas actúan en localizaciones internas en la celulosa. El producto primario de esas enzimas es celobiosa, la cual es hidrolizada posteriormente a glucosa mediante β -glucosidasa. Se sabe que la mayoría de los CBH y EG se enlazan a la celulosa en la materia prima a través de módulos de enlazamiento de carbohidrato (CBM), tales como dominios de enlazamiento de celulosa (CB), mientras que la mayor parte de las enzimas β -glucosidasas, incluyendo las enzimas de β -glucosidasa de *Trichoderma* y *Aspergillus*, no contienen tales módulos de enlazamiento y por lo tanto permanecen en solución durante la hidrólisis. Las enzimas de celulasa pueden contener una región de enlazamiento que conecta el dominio catalítico al módulo de enlazamiento de carbohidratos. Se cree que en la región de enlazamiento facilita la actividad del dominio activo catalíticamente.

La cinética de la hidrólisis enzimática de sustrato celulósicos insolubles por celulasas no sigue el comportamiento simple de Michaelis-Mentea (Zhang et al., 1999). Específicamente, al incrementar la dosis de celulasa en una reacción de hidrólisis no se provee un incremento linealmente dependiente en la cantidad de glucosa producida en un tiempo dado. También hay un descenso significativo en la tasa de reacción a medida que avanza la hidrólisis de la celulosa (Tolan, 2002). Se han propuesto varias explicaciones para explicar el descenso en la tasa de reacción. La hipótesis principal incluye inhibición por producto, incremento de la resistencia del sustrato a través del transcurso de una hidrólisis e inactivación enzimática.

La cinética de la acción de la celulasa hace que la hidrólisis enzimática del material de pretratamiento una etapa ineficiente en la producción de etanol de celulosa. La reducción de costos asociada con la hidrólisis enzimática, a través del incremento de la producción o actividad de la celulasa, se ha identificado como una oportunidad principal para ahorro de costes (Sheehan, 1999). Un reporte reciente de un taller de etanol celulósico patrocinado por el United States Department of Energy estimó un coste de 10 a 25 veces más alto para producir las enzimas para etanol de celulosa que para las enzimas requeridas para producir etanol a partir de almidón (Houghton, 2006).

Se han hecho muchas aproximaciones para incrementar la actividad de las mezclas de celulasa. El incremento de la cantidad de β -glucosidasa producida por el microorganismo el cual también secreta las celulasas mixtas alivia la inhibición por producto por celobiosa (Patente de los Estados Unidos No. 6, 015,703). Las técnicas de diseño racional o mutagénesis aleatoria también pueden ser utilizadas para modular las propiedades de enzimas individuales tal como lo demuestra la producción de una variante de CBH1 con termoestabilidad incrementada (U.S. 2005/0277172). Un método para explorar la diversidad genética es verificar directamente los homólogos enzimáticos de muchas especies celulolíticas. Esta metodología ha sido aplicada con CBH1 (U.S. 2004/0197890) y CBH2 (U.S. 2006/0053514). La construcción de una proteína de fusión que combina actividades complementarias de enzimas endo y exo celulolíticas también se ha demostrado (U.S. 2006/0057672). La estructura del dominio modular de las enzimas celulolíticas ha permitido la construcción de enzimas que comprenden el dominio catalítico. La ausencia de CBD tiene efectos dramáticos sobre el enlazamiento de sustrato y las actividades de estas enzimas (Patente de los Estados Unidos No. 7, 419,809, U.S. 2006/0008885). Se han creado enzimas para hidrólisis de celulosa manipuladas genéticamente que comprenden combinaciones novedosas del dominio catalíticamente activo, la región enlazante y el CBD (Patente de los Estados Unidos No. 5,763, 254).

Todas las metodologías escritas anteriormente, a la vez que apuntan a diferentes aspectos de la hidrólisis enzimática de la celulosa, no han incrementado la actividad de celulasa de manera suficiente para superar los altos costes de la celulasa para la hidrólisis de celulosa. Una desventaja de estas estrategias ha sido enfocarse en una enzima individual a la vez, despreciando las sinergias posibles con otras enzimas celulolíticas.

Por lo tanto, una mejor metodología para incrementar la actividad de un sistema de celulasa es enfocarse en maximizar la actividad de una mezcla que contiene más de un componente de celulasa. Se ha reportado que la eficiencia de la hidrólisis de celulosa por una combinación de endo y exo celulasas es mucho mayor de lo que se esperaría sumando las actividades de estas enzimas que actúan en aislamiento (Wood and McCrae, 1979). Estudios previos han medido la sinergia entre las enzimas celulolíticas de *T. reesei* observando el comportamiento de mezclas binarias o ternarias (por ejemplo Nidetsky et al., 1994). Por ejemplo, Wood et al., (1989) estudiaron mezclas binarias, terciarias y septenarias de celobiohidrolasas y endoglucanasas de *Penicillium pinophilum*. Sin embargo, no se observó sinergia en las mezclas binarias de enzimas de *Penicillium*. El sinergismo de las combinaciones binarias de tres enzimas de la bacteria *Thermobifida fusca*, dos de las cuales son de las mismas familias que las que

comprenden las principales enzimas de *Trichoderma*, también han sido caracterizado (Jeoh, 2006). Sin embargo, no se ha reportado un rendimiento mejorado.

5 Se han hecho varios intentos para desarrollar una mezcla de CBH y EG para maximizar la cantidad de hidrólisis de celulosa para una dosificación de enzima dada (la dosificación de enzima es la masa de enzima requerida para hidrolizar una masa dada de celulosa). Por ejemplo, se han reportado mezclas optimizadas de celulasas de origen mixto incluyendo bacterias, derivadas principalmente de *T. fusca* (Irwin, 1993; Walker et al., 1993; Kim et al; 1998). Se incluyeron CBH1 y CBH2 de *Trichoderma* en estos estudios, pero las bacterias fueron incapaces de producir celulasas de la familia 7 y el EG1 por lo tanto no fue parte de estas mezclas. Baker et al., (1998) intento determinar una mezcla óptima de CBH1, CBH2 y EG1 de *Trichoderma*, pero no incluyo EG2 en su experimento. En el caso de Baker et al., el sustrato fue Sigmacell, una preparación de celulosa microcristalina. Boisset et al., (2001) llevo a cabo una optimización de una mezcla ternaria de CBH1, CBH2 y EG5 derivados de *Humicola insolens* sobre el sustrato de celulosa bacteriana. Sin embargo, estos estudios no tuvieron éxito en el desarrollo de mezclas enzimáticas de celulasa con rendimiento mejorado para la hidrólisis de celulosa en una biomasa lignocelulósica pretratada.

15 Así, a pesar de mucho esfuerzo de investigación, sigue existiendo una necesidad para una mezcla enzimática de celulasas mejorada para la hidrólisis de celulosa en una materia prima lignocelulósica pretratada. La ausencia de tal mezcla enzimática representa un gran obstáculo en la comercialización de la conversión de celulosa a azúcares solubles incluyendo glucosa para la producción de etanol y otros productos.

Resumen de la invención

20 La presente invención se relaciona con una mezcla enzimática. También se provee un proceso para la hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica, en particular para la hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica pretratada.

Es un objeto de la invención proveer un proceso para una hidrólisis enzimática mejorada de una materia prima lignocelulósica pretratada.

25 En particular, la presente invención provee la conversión potenciada de una materia prima lignocelulósica pretratada a azúcares solubles utilizando un grupo de combinaciones de las cuatro enzimas de celulosa primarias, CBH1, CBH2, EG1 y EG2.

30 De acuerdo con un aspecto de la invención, se provee un proceso para la hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica pretratada a azúcares solubles, comprendiendo la hidrólisis enzimática la adición de una mezcla de enzimas celulasa a la materia prima lignocelulósica pretratada, comprendiendo la mezcla enzimática de celulasa una mezcla de celulasa primaria de celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 y endoglucanasas EG1 y EG2, estando presentes las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 a más de o igual a 55% y menos de 85% de la mezcla de celulasa primaria y estando presente la CBH2 en una fracción con respecto a las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 tal como se define por f_{C2} y estando presente la EG2 en una fracción con respecto a las endoglucanasas EG1 y EG2 tal como se define por f_{E2} , en donde

35 Cuando la celobiohidrolasa CBH1 y CBH2 están presentes en más que o igual a 55% y menos de 65% de las celulasas primarias, f_{C2} y f_{E2} están en valores incluidos dentro de la zona 1 de la figura 3A;

Cuando las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes a más de o igual a 65% y menos de 75% de las celulasas primarias, f_{C2} y f_{E2} están en valores incluidos dentro de las zonas 1, 2 y 3 de la figura 3B; y

40 Cuando las celuhidrolasas CBH1 Y CBH2 están presentes en más de o igual a 75% y menor de 85% de las celulasas primarias, f_{C2} y f_{E2} están en valores incluidos dentro de las zonas 1, 2 y 3 de la figura 3C.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se provee una mezcla de enzimas de celulasa como se definió anteriormente.

45 Preferiblemente, las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes a más de o igual a 65% y menos de 85% de las celulasas primarias. Cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes a 65% hasta 75% de las celulasas primarias, f_{C2} y dicho f_{E2} están cada uno preferiblemente en valores incluidos dentro de las zonas 2 y 3 de la figura 3B. Preferiblemente, f_{C2} y f_{E2} están cada uno en valores incluidos dentro de la zona 3 de la figura 3B. Cuando la celobiohidrolasa CBH1 Y CBH2 están presentes a 75% hasta 85% de las celulasas primarias, f_{C2} y f_{E2} están preferiblemente en valores incluidos dentro de las zonas 2 y 3 de la figura 3C. Preferiblemente, f_{C2} y f_{E2} están cada uno en valores incluidos dentro de la zona 3 de la figura 3C.

- 5 La presente invención también es pertinente a cualquiera de los aspectos antes mencionados de la invención como se definió anteriormente, en donde las celulasas primarias son de una fuente fúngica. Las secuencias de codificación de la celulasa primaria pueden ser de una Ascomiceto o Basidiomiceto. Preferiblemente, las celulasas primarias son de *Trichoderma ssp.*, *Aspergillus ssp.*, *Hypocrea ssp.* o *Humicola ssp.* Más preferiblemente, las secuencias de codificación de la celulasa primaria son de *Trichoderma reesei*.
- 10 La presente invención también es pertinente a cualquiera de los aspectos antes mencionados de la invención tal como se definió anteriormente, en donde las celulasas primarias se obtienen a partir de un organismo expresando secuencias de codificación que son endógenas a dicho organismo. Alternativamente, las celulasas primarias se obtienen a partir de organismos expresando secuencias de codificación las cuales son heterólogos a dicho organismo. Preferiblemente, las celulasas primarias son de *Trichoderma reesei*.
- 15 Preferiblemente, la hidrólisis enzimática convierte al menos aproximadamente 80% de la celulosa en la materia prima lignocelulósica pretratada a azúcares solubles. Los azúcares solubles pueden ser fermentados para producir etanol, ácido láctico, butanol o una combinación de los mismos.
- 20 La hidrólisis enzimática se lleva a cabo preferiblemente con enzimas celulasas que comprenden β -glucosidasa y un secretoma de *Trichoderma reesei*.
- 25 Las mezclas de celulasa primaria abarcadas por la invención despliegan actividad significativamente más alta que las descritas en la técnica anterior. Los resultados muestran que en las mezclas de celulasa de la presente invención van desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 50%, o cualquier cantidad entre ellos, aproximadamente 10% hasta 25% o cualquier cantidad entre ellos, o desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 15%, o cualquier cantidad entre ellos, más potente o más activa que las mezclas de celulasa disponibles actualmente.
- 30 La factibilidad económica de la tecnología celulosa a etanol ha estado limitada por el coste de las enzimas celulasas. Proveyendo las enzimas con actividad mejorada, las enzimas celulasa de la presente invención incrementan la economía del proceso y representan un avance significativo sobre la técnica anterior.
- 35 El resumen de la invención no necesariamente describe todas las características de la invención.
- 40 Breve descripción de los dibujos
- 45 La figura 1 contiene los análisis SDS-PAGE y de inmunoprecipitación Western de los componentes de celulasa primaria purificados. La figura 1A muestra una tinción con azul de Coomassie de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 purificados después de SDS-PAGE. Se analizó una celulasa de *Trichoderma* en paralelo para comparación. La figura 1B muestra inmunoprecipitaciones Western específicas del componente de estas muestras llevadas a cabo después de la separación en SDS-PAGE y de electrotransferencia a una membrana PVDF.
- 50 La figura 2 es una gráfica de columnas que representan los resultados de los análisis ELISA. Las columnas en negro sólido ilustran la composición en porcentaje de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 en celulasa de *Trichoderma* comercial. Las columnas restantes demuestran el nivel de especificidad de cada ELISA. Se muestra la composición porcentual de: CBH1 en células libre de CBH1 (a), CBH2 en una celulasa libre de CBH2 (b), EG1 en una celulasa libre de EG1 (c) y EG2 en una celulasa libre de EG2 (d).
- 55 La figura 3 muestra gráficas de las actividades enzimáticas de mezclas de celulasa primaria que contiene CBH1, CBH2, EG1 y EG2. Las actividades de diversas mezclas de celulasa se representan como medidas a diversos contenidos fraccionados de EG2 con respecto a la cantidad total de EG y de CBH2 con respecto al contenido total de CBH (representados como f_{E2} y f_{C2} , respectivamente). El valor listado dentro de cada cuadrado indica la actividad en la mezcla en comparación con el valor de referencia tal como se describe en los ejemplos. Las actividades de las diversas mezclas de celulasa se expresan con respecto a las actividades de una Mezcla de Referencia (CBH1, CBH2, EG1, EG2, a 57%, 29%, 7%, 7%, % en peso). La figura 3A muestra las actividades de mezclas en las cuales el contenido de CBH1 y CBH2 combinado es superior a o igual a 55% y menor de 65% de las celulasas primarias totales.
- 60 La figura 3B muestra las actividades de mezclas en las cuales el contenido de CBH1 y CBH2 combinado es superior a o igual a 65% y menor de 75% de las celulasas primarias totales. La figura 3C muestra las actividades de mezclas en las cuales el contenido de CBH1 y CBH2 combinado es superior a o igual a 75% y menor de 85% de las celulasas primarias totales.
- 65 La figura 3D muestra las actividades de mezclas en las cuales el contenido de CBH1 y CBH2 combinado es superior a o igual a 85% y menor de o igual a 95% de las celulasas primarias totales.

La figura 4 es una gráfica tridimensional que muestra las regiones ocupadas por mezclas mejoradas de celulasas primarias en el espacio de mezcla definido por porcentaje de CBH, f_{C2} y f_{E2} . Las actividades son relativas a la Mezcla de Referencia. Cada pareja de imágenes provee dos vistas de la misma región y difieren en una rotación de 180 grados alrededor del eje de porcentaje de CBH. La figura 4A muestra mezclas que comprenden la zona 1 de la figura 3A y regiones de la zona 1, 2 y 3 de las figuras 3B y 3C. La figura 4B muestra mezclas que comprenden regiones de la zona 2 y 3 de las figuras 3B y 3C. La figura 4C muestra mezclas que comprenden regiones de la zona 3 de las figuras 3B y 3C.

La figura 5 es una gráfica que muestra la conversión del sustrato lignocelulósica pretratado por la Mezcla de Referencia, la cual es una mezcla compuesta de celulasas primarias en las proporciones relativas observadas en una celulasa tipo silvestre, y una mezcla mejorada representativa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con una mezcla enzimática. También se provee un proceso para la hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica, en particular para la hidrólisis enzimática de una mezcla lignocelulósica pretratada.

La siguiente descripción se refiere a realizaciones preferidas.

La presente invención se relaciona con una mezcla enzimática de celulasa que comprende celulasas primarias para ser usada para la hidrólisis de una materia prima lignocelulósica pretratada. "Enzimas de celulasa primaria" o "celulasas primarias" se definen como las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2, y las endoglucanasas EG1 y EG2. Además de las celulasas primarias, CBH1, CBH2, EG1 y EG2, la mezcla de enzimas de celulasa puede comprender celulasas adicionales así como componentes enzimáticos de β -glucosidasa como se describe en mayor detalle más adelante.

Las siguientes definiciones se refieren a la clasificación de las celobiohidrolasas, endoglucanasas y β -glucosidasas tal como lo definió la Joint Commission on Biochemical Nomenclature of the International Union Biochemistry and Molecular Biology (Published in Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, California, ISBN 0-12-227164-5; con suplementos en Eur. J. Biochem. 1997, 250; 1-6, y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650, y con las familias de glicohidrolasa de las celulasas y β -glucosidasas tal como se definen con el sistema CAZY el cual es aceptado como una nomenclatura estándar para las enzimas de glicohidrolasa (Coutinho, P.M. & Henrissat, B., 1999. "Carbohydrate-active enzymes; an integrated database approach". In Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering, H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12 véase también: afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY) y es familiar para los experimentados en la técnica.

"CBH1" es una enzima activa en carbohidratos expresada a partir de una secuencia de ADN que codifica para un dominio catalítico de glicohidrolasa (GH) de familia 7 clasificado bajo EC 3.2.1.91. Cualquier enzima activa en carbohidratos con una identidad en secuencia de aminoácidos de 60% a 100% con cualquier enzima CBH1 o más preferiblemente 65% a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos que exhibe actividad de CBH1 tal como es conocido para una persona experimentada en la técnica (véanse referencias de nomenclatura de celobiohidrolasa), se define de la misma forma como CBH1. Por ejemplo, la CBH1 puede ser cualquier enzima activa en carbohidratos con 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima CBH1 que exhiba actividad de CBH1 como es conocida por una persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, la CBH1 está enlazada funcionalmente a un módulo de enlazamiento de carbohidrato (CBM) con una alta afinidad por celulosa cristalina, tal como un dominio de enlazamiento de celulosa de familia 1.

La identidad de la secuencia puede determinarse fácilmente por alineamiento de los aminoácidos de las dos secuencias, bien sea utilizando alineamiento manual, o cualquier algoritmo de alineamiento de secuencias conocido para una persona experimentada en la técnica, por ejemplo, pero no limitándose a algoritmo BLAST (BLAST y BLAST 2.0; Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990), el algoritmo divulgado por Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda de similitud por el método de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. Suplemento de 1995).

"CBH2" se define como una enzima activa con carbohidratos expresada a partir de una codificación secuenciada de ADN para un dominio catalítico de familia 6 de glicohidrolasa (GH) clasificado bajo EC 3.2.1.91. Cualquier enzima activa en carbohidratos con 60% a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima CBH2, o más preferiblemente 65% a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos y que exhibe actividad de CBH2, tal

5 como es conocido por un experto en la técnica (véase referencias para la nomenclatura de celubiohidrolasas), se define de manera similar como una CBH2. Por ejemplo, la CBH2 puede ser cualquier enzima activa en carbohidratos con 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima CBH2 y que exhibe actividad de CBH2 tal como es conocido para una persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, la CBH2 está enlazada funcionalmente a un módulo de enlazamiento de carbohidratos (CBM) con una alta afinidad por celulosa cristalina, tal como el dominio de enlazamiento de celulosa de familia 1. La identidad de secuencia puede determinarse como se definió anteriormente.

10 "EG1" se define como una enzima activa en carbohidratos expresada a partir de una codificación de secuencia de ADN para un dominio catalítico de glicohidrolasa (GH) de familia 7 clasificado bajo EC 3.2.1.4. Cualquier enzima activa en carbohidratos con 60% a 100% o más preferiblemente de 65 a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima EG1 y que exhibe actividad EG1 tal como es conocida por un experto en la técnica (véase referencias para la nomenclatura de endoglucanasas), se define de la misma forma como una EG1. Por ejemplo, la EG1 puede ser cualquier enzima activa en carbohidratos con 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima EG1 y que exhibe actividad de EG1 tal como es conocido por un experto en la técnica. Preferiblemente, la EG1 está enlazada funcionalmente a un módulo de enlazamiento de carbohidratos (CBM) con una alta afinidad por celulosa cristalina, tal como un dominio de enlazamiento de celulosa de familia 1. La identidad en secuencia puede determinarse como se definió anteriormente.

20 ""EG2" se define como una enzima activa en carbohidratos expresada a partir de una codificación de secuencia de ADN para un dominio catalítico de glicohidrolasa (GH) de familia 5 clasificado bajo EC 3.2.1.4. Cualquier enzima con actividad en carbohidratos con 60% a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos, o más preferiblemente 65% a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima EG2 y que exhiba actividad de EG2 tal como es conocido por una persona experimentada en la técnica (véanse referencias para nomenclatura de endoglucanasas), se define de la misma forma como una EG2. Por ejemplo, la EG2 puede ser cualquier enzima activa en carbohidratos con 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima EG2 y que exhibe actividad de EG2 como es conocido para una persona experimentada en la técnica. Preferiblemente, la EG2 está enlazada funcionalmente a un módulo de enlazamiento de carbohidratos (CBM) con una alta afinidad por celulosa cristalina, tal como un dominio de enlazamiento de celulosa de familia 1. La identidad de secuencia puede determinarse como se definió anteriormente.

30 "β-glucosidasa" se define como cualquier enzima de la familia 3 de GH que también está clasificada abajo en EC 3.2.1.21. La BGL1 se define como la enzima expresada a partir del gen bgl1 de Trichoderma reesei. Cualquier secuencia de proteína con 60% a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con la enzima BGL1 o más preferiblemente 65% a 100% de identidad en secuencia de aminoácidos y que exhiba actividad de β-glucosidasa tal como es conocido por un experto en la técnica (véanse referencias para la nomenclatura de endoglucanasas), se definen de la misma forma como una BGL1. Por ejemplo, la BGL1 puede ser cualquier enzima activa en carbohidratos con 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de identidad en secuencia de aminoácidos con cualquier enzima BGL1 que exhiba actividad de BGL1 como es conocido por una persona experimentada en la técnica. La identidad en secuencias puede determinarse como se definió anteriormente.

40 Las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 dentro de la mezcla de enzimas de celulasa de la presente invención (esto es, el contenido combinado de CBH1 y CBH2) están presentes en más de o igual a 55% y menos de 85% de la mezcla de celulasa primaria, dentro de la mezcla de celulasa (esto es, las cantidades de CBH1 y CBH2 comprenden desde aproximadamente 55% hasta aproximadamente 85% de la mezcla de celulasa primaria, de la mezcla de enzima de celulasa. Dentro de este rango de mezclas de CBH1 y CBH2, tres conjuntos de mezclas de estas enzimas de celulasa primarias, dependientes de las fracciones diferentes del contenido combinado de CBH1 y CBH2 con respecto a las celulasa primarias (representada como el porcentaje CBH en las figuras 3A, 3B y 3C), han sido identificadas por exhibir una ventaja en llevar a cabo la hidrólisis de una materia prima lignocelulósica. Estos conjuntos de mezclas pueden ser definidos por la fracción de CBH2 con respecto a las celobiohidrolasas de CBH1 y CBH2 (sobre una base de cantidad, peso o peso: volumen), en donde esta fracción se denomina como f_{C2} :

$$f_{C2} = CBH2 / (CBH1 + CBH2).$$

50 La fracción EG2 con respecto a las endoglucanasas EG1 y EG2 se denominan f_{E2} :

$$f_{E2} = EG2 / (EG1 + EG2).$$

Las mezclas de componentes para la primera, segunda y tercera mezclas están mapeadas en las figuras 3A, 3B y 3C, respectivamente. En la figura 4 se muestran la representaciones tridimensionales del espacio de mezclas de componentes descritos por estas mezclas.

ES 2 441 576 T3

CBH1 y CBH2 que comprenden desde aproximadamente 55% hasta aproximadamente 65% de la mezcla de celulasa primaria.

5 Cuando las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes a más de o igual a 55% o menos de 65% de las celulasas primarias, la fracción de celobiohidrolasas que es CBH2 (f_{C2}) y la fracción de endoglucanasas que es EG2 (f_{E2}) está cubierta por la zona 1 de la figura 3ª. La zona 1 de la figura 3A incluye las siguientes tres regiones:

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.35;

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25; y

10 valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45.

CBH1 y CBH2 que comprenden desde aproximadamente 65% hasta aproximadamente 75% de la mezcla de celulasa primaria.

15 Cuando las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes a más de o igual a 65% y menos de 75% de las celulasas primarias, f_{C2} y f_{E2} están en los valores incluidos dentro de las zonas 1, 2 y 3 de la figura 3B. Las zonas 1, 2 y 3 incluyen las siguientes regiones:

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.25 y menores de 0.35 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.35;

20 valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.55;

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.65 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.65; y

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.65 y menores de 0.75 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55.

25 Las zonas 2 y 3 de la figura 3B incluyen las siguientes regiones:

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.25 y menores de 0.35 y valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.35;

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.55; y

30 valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.65 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55.

La zona 3 de la figura 3B incluye las siguientes dos regiones:

valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55; y

35 valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45.

Preferiblemente, f_{C2} y f_{E2} incluyen valores dentro de las zonas 2 y 3 de la figura 3B. Más preferiblemente, f_{C2} y f_{E2} incluyen valores dentro de la zona 3 de la figura 3B.

40 CBH1 y CBH2 que comprenden desde aproximadamente 75% hasta aproximadamente 85% de la mezcla de celulasa primaria

ES 2 441 576 T3

Cuando la celobiohidrolasa CBH1 Y CBH2 están presentes en menos de o igual a 75% y en menos de 85% de las celulasas primarias, f_{C2} y f_{E2} están en los valores incluidos dentro de las zonas 1, 2 y 3 de la figura 3C. Las zonas 1, 2 y 3 incluyen las siguientes regiones:

- 5 valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.25;
- valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.65; y
- valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.35.
- 10 Las zonas 2 y 3 incluyen las siguientes tres regiones:
- valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25;
- valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55; y
- 15 valores f_{C2} superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25.
- La zona 3 define una región sencilla que incluye valores f_{C2} entre 0.45 y 0.55 y valores f_{E2} entre 0.15 y 0.25.
- Preferiblemente, f_{C2} y f_{E2} incluyen valores dentro de las zonas 2 y 3 de la figura 3C. Lo más preferiblemente, f_{C2} y f_{E2} incluyen valores dentro de la zona 3 de la figura 3C.
- 20 La fracción o porcentaje de cada componente celulasa dentro de la mezcla de celulasas se determina utilizando los métodos del ejemplo 3.
- Por lo tanto, la presente invención provee una mezcla de enzimas y un proceso para la hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica pretratada hasta azúcares solubles que comprende hidrolizar la materia prima pretratada con la mezcla de enzimas. La mezcla de enzimas de celulasa comprende una mezcla de celulasa primaria de celobiohidrolasas de CBH1 y CBH2 y endoglucanasas EG1 y EG2. Las celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes en un contenido combinado superior a o igual a 55% y menor de 85% de la mezcla de celulasa primaria. La CBH2 está presente a una fracción definida por f_{C2} , con respecto a la celobiohidrolasa CBH1 y CBH2, y la EG2 está presente en una fracción, definida por f_{E2} , con respecto a las endoglucanasas EG1 y EG2, en donde
- 25
- 30 (i) cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o iguales a 55% y menores de 65% de las celulasas primarias, dichas f_{C2} y f_{E2} están en valores incluidos dentro de las Zonas I de la Figura 3A;
- (ii) cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o iguales a 65% y menores de 75% de las celulasas primarias, dichas f_{C2} y f_{E2} están en valores incluidos dentro de las Zonas 1, 2, y 3 de la Figura 3B; y
- 35 (iii) cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o iguales a 75% y menores de 85% de las celulasas primarias, dichas f_{C2} y f_{E2} están en valores incluidos dentro de las Zonas 1, 2, y 3 de la Figura 3C.
- La mezcla de enzimas de celulasa de la invención se utiliza para la hidrólisis enzimática de una "materia prima lignocelulósica pretratada". Una materia prima lignocelulósica pretratada es un material de origen vegetal que, antes del pretratamiento, contiene al menos 20% de celulosa (peso seco) y al menos 12% de lignina (peso seco) y que ha sido sometida a un proceso físico y/o químico para hacer la fibra más accesible y/o receptiva a las acciones de las enzimas celulolíticas.
- 40
- Después del pretratamiento, la materia prima lignocelulósica puede contener más de aproximadamente 20% en celulosa y más de aproximadamente 12% de lignina. En una realización, la materia prima lignocelulósica pretratada contiene más de aproximadamente 20% de celulosa y más de aproximadamente 10% de lignina.

- Las materias primas lignocelulósicas que pueden ser utilizadas en la invención incluyen, pero no se limitan a, residuos agrícolas tales como leña, espiga de trigo, espiga de cebada, espiga de avena, espigas de arroz, espiga de canola, y leña de soja; residuos de procesos de fibras tales como fibra de maíz, pulpa de remolacha de azúcar, finos y rechazos de molienda de pulpa o bagazo de caña de azúcar; residuos forestales tales como madera de álamo, otras maderas duras, madera blanda y aserrín; o pastos tales como pasto de aguja, miscanthus, pasto de cordón, and pasto rojo canario.
- La materia prima lignocelulósica puede ser sometida primero a reducción de tamaño por métodos que incluyen, pero no se limitan a, molienda, trituración, agitación, desgarre, compresión/expansión, u otros tipos de acción mecánica. La reducción de tamaño por acción mecánica puede llevarse a cabo mediante cualquier tipo de equipo adaptado para ese propósito, por ejemplo, pero no limitándose a, un molino de martillos.
- Ejemplos no limitantes de procesos de pretratamiento incluyen tratamiento químico de una materia prima lignocelulósica con ácido sulfúrico o sulfuroso, u otros ácidos; amoníaco, caliza, hidróxido de amonio, u otras bases; etanol, butanol u otros solventes orgánicos; o agua presurizada (véase las Patentes de los Estados Unidos No. 4,461,648, 5,916,780, 6,090,595, 6,043,392, 4,600,590, Weil et al. (1997) y Öhgren. K., et al. (2005).
- El pretratamiento puede ser llevado a cabo para hidrolizar la hemicelulosa, o una porción de la misma, que está presente en la materia prima lignocelulósica hasta azúcares monoméricos, por ejemplo, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, o una combinación de los mismos. Preferiblemente, el pretratamiento se lleva a cabo de tal manera que casi se complete la hidrólisis de la hemicelulosa y ocurra una pequeña cantidad de conversión de celulosa a glucosa. Durante el pretratamiento, se utiliza una concentración de ácido en la pasta acuosa desde aproximadamente 0.02% (p/p) hasta aproximadamente 2% (p/p), o cualquier cantidad entre ellas, para el tratamiento de la materia prima lignocelulósica. Preferiblemente, el ácido usado durante el pretratamiento es ácido sulfúrico.
- La materia prima lignocelulósica pretratada puede ser procesada después del pretratamiento pero antes de la hidrólisis enzimática mediante cualquiera de varias etapas, tales como dilución con agua, lavado con agua, regulación, filtración o centrifugación, o una combinación de estos procesos, según sea familiar para los experimentados en la técnica.
- La materia prima lignocelulósica pretratada se somete a continuación a hidrólisis enzimática. Mediante el término "hidrólisis enzimática", se entiende un proceso mediante el cual las enzimas de celulasa actúan sobre la celulosa para convertir toda o una porción de las mismas en azúcares solubles. Se entiende que los azúcares solubles incluyen monómeros y oligómeros de hexosa solubles en agua de hasta 6 unidades monoméricas que son derivados de la porción de celulosa de la materia prima lignocelulósica pretratada. Ejemplos de azúcares solubles son glucosa, celubiosa, celodextrinas, o mezclas de los mismos. Preferiblemente, los azúcares solubles son predominantemente celubiosa y glucosa. En una realización más preferida, los azúcares solubles son predominantemente glucosa.
- El proceso de hidrólisis enzimática convierte preferiblemente de forma aproximada 80% hasta aproximadamente 100% de la celulosa en azúcares solubles como cualquier rango entre estos. Más preferiblemente, el proceso de hidrólisis enzimática convierte aproximadamente 90% hasta aproximadamente 100% de la celulosa en azúcares solubles, o cualquier rango entre estos. En la realización más preferida, el proceso de hidrólisis enzimática convierte aproximadamente 98% hasta aproximadamente 100% de la celulosa en azúcares solubles, o cualquier rango entre estos.
- La hidrólisis enzimática que utiliza la mezcla de celulasa puede ser hidrólisis por lotes, hidrólisis continua o una combinación de los mismos. La hidrólisis puede ser bajo agitación, sin mezcla, o una combinación de los mismos.
- La hidrólisis enzimática se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 45°C hasta aproximadamente 75°C, o cualquier cantidad entre ellos, y un pH de aproximadamente 3.5 hasta aproximadamente 7.5 o cualquier cantidad entre ellos. La concentración inicial de celulosa en el reactor de hidrólisis, antes del inicio de la hidrólisis, es preferiblemente aproximadamente 4% (p/p) hasta aproximadamente 15% (p/p), o cualquier cantidad entre ellos. La dosificación combinada de todas las enzimas de celulasa primarias puede ser aproximadamente 5 hasta aproximadamente 45 mg de proteína por gramo de celulosa, o cualquier cantidad entre ellos. La hidrólisis puede llevarse a cabo durante un periodo de tiempo de aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 200 horas, o cualquier cantidad entre ellos. Preferiblemente, la hidrólisis se lleva a cabo durante un periodo de 15 horas hasta 100 horas. Debe apreciarse que las condiciones de reacción no implican limitar la invención de cualquier manera y pueden ser reajustadas según se desee por los expertos en la técnica.
- La hidrólisis enzimática se lleva a cabo típicamente en un reactor de hidrólisis. Las enzimas de celulasa primarias se agregan a la materia prima lignocelulósica pretratada (también denominada como "sustrato"), antes de, durante, o después de la adición del sustrato al reactor de hidrólisis.

5 Preferiblemente, las celulasas primarias se producen en una o más fermentaciones en cultivo líquido sumergido y se separan de las células al final de la fermentación. Las células pueden ser separadas de las celulasas por filtración, centrifugación u otros procesos familiares para los experimentados en la técnica. Una fracción que contiene celulasa libre de células puede ser concentrada entonces (por ejemplo, a través de ultrafiltración), conservada y/o estabilizada antes de su uso. Alternativamente, las celulasas primarias no se separan de las células, sino que son agregadas a la hidrólisis enzimática con las células.

10 La mezcla de celulasa puede ser una solución acuosa de proteína en agua, o una pasta de proteína en agua, un polvo sólido o gránulo, o un gel. La mezcla que contiene las enzimas de celulasa puede incluir aditivos tales como reguladores, detergentes, estabilizantes, agentes de relleno, u otros aditivos tales familiares para los experimentados en la técnica.

15 Preferiblemente, las celulasas primarias se expresan a partir de secuencias de codificación fúngica. En esta realización, las secuencias de codificación serían de cualquier fuente fúngica. Los términos "hongos", "hongo", "fúngico", "Ascomicotina", "Basidiomicotina", y términos relacionados (por ejemplo "ascomicetos" y "basidiomicetos", se entiende que incluyen aquellos organismos definidos como tales en *The Fungi: An Advanced Treatise* (GC Ainsworth, FK Sparrow, AS Sussman, eds.; Academic Press 1973).

20 Cualquier fuente de enzimas de celulasa puede ser utilizada en la práctica de la invención. Las secuencias de codificación de las celulasas de la invención son preferiblemente de Ascomicotina o Basidiomicotina. Por ejemplo las secuencias de codificación son de los géneros seleccionados de *Trichodermassp.*, *Aspergillusssp.*, *Hypocreassp.*, *Humicolassp.*, *Neurosporassp.*, *Orpinomycesssp.*, *Gibberellasp.*, *Emericella ssp.*, *Chaetomiussp.*, *Fusarium ssp.*, *Penicilliumssp.*, *Magnaporthesp.*, and *Phanerochaetessp.* Preferiblemente, las secuencias de codificación para las celulasas primarias son de *Trichoderma reesei*.

25 Las celulasas primarias de la invención pueden ser clonadas y expresadas en un microorganismo conocido para los experimentados en la técnica como un anfitrión de expresión, tal como una bacteria o un hongo. Preferiblemente, el microorganismo es un hongo. El constructo genético puede ser introducido en el microbio anfitrión por cualquier número de métodos conocidos por una persona experimentada en la técnica de la transformación microbiana, incluyendo pero no limitándose a, tratamiento de células con CaCl_2 , electroporación, bombardeo biolístico, fusión mediada por PEG de protoplastos (por ejemplo White et al., WO 2005/093072, el cual se incorpora aquí como referencia).

30 Todas las celulasas primarias pueden ser expresadas a partir de una cepa de un organismo. Alternativamente, las celulasas primarias pueden ser expresadas individualmente o en subgrupos a partir de diferentes cepas de diferentes organismos. También se contempla que las celulasas primarias puedan ser expresadas individualmente o en subgrupos a partir de diferentes cepas de un organismo individual, tal como a partir de diferentes cepas de *Trichoderma reesei*. Preferiblemente, todas las celulasas son expresadas a partir de una cepa individual de *Trichoderma reesei*.

35 Las celulasas primarias son preferiblemente parte de un sistema de celulasa total producida por el organismo de expresión. En una realización, las celulasas primarias son las únicas enzimas celulasa del sistema de celulasas. En otra realización, las celulasas primarias son parte de un sistema de celulasas que incluye β -glucosidasa.

40 Las celulasas primarias pueden ser parte de un sistema de celulasa total que incluye el secretoma del *Trichoderma reesei*. Mediante el término "secretoma", se entiende todas las proteínas secretadas extracelularmente en el medio de crecimiento por parte de un organismo específico. En una realización preferida, las celulasas primarias son parte de un sistema de celulasa total que incluyen la BGL1 β -glucosidasa de *Trichoderma reesei* y el secretoma de *Trichoderma reesei*.

45 Los azúcares solubles producidos por la hidrólisis enzimática pueden ser fermentados por microbios. Los productos de fermentación pueden incluir cualquier producto deseado que genere valor a la planta de fermentación. Los productos de fermentación preferidos son etanol, butanol y ácido láctico, todos los cuales tienen grandes mercados y son fabricados eficientemente por muchos microbios. Para la producción de etanol, la fermentación puede llevarse a cabo por uno o más de un microbio que sea capaz de fermentar los azúcares a etanol. Por ejemplo, la fermentación puede llevarse a cabo mediante la levadura recombinante *Saccharomyces* que ha sido manipulada para fermentar glucosa, manosa, galactosa y xilosa hasta etanol, o glucosa, manosa, galactosa, xilosa y arabinosa hasta etanol. Las levaduras recombinantes que pueden fermentar la xilosa a etanol están descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 5, 789,210 (la cual se incorpora aquí como referencia). La levadura produce un caldo de fermentación que comprende etanol en una solución acuosa. Para la producción de ácido láctico, la fermentación puede ser llevada a cabo por un microbio que fermente los azúcares a ácido láctico.

55 En una realización de la invención, las mezclas de enzimas celulasas son producidas expresando las celulasas primarias a partir de un microorganismo a valores de pH ácidos. Preferiblemente, los valores de pH están entre

aproximadamente 2 y aproximadamente 5. Por ejemplo, el pH de la fermentación puede ser aproximadamente 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8 o 5.0, o cualquier pH entre ellos.

5 Las mezclas enzimáticas de la invención son de composición muy diferente a las descritas en la técnica anterior para hidrólisis por celulasa. Las mezclas de celulasa primarias de la invención son composiciones que difieren significativamente de una "Mezcla de Referencias", una composición de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 de 57%, 29%, 7%, 7% respectivamente. Las mejores mezclas están mapeadas en las figuras 3A, 3B y 3C y la Mezcla de Referencia está indicada cuando se presenta en el espacio de mezcla mapeado en la figura 3D. Las representaciones tridimensionales de los espacios de mezcla en los componentes descritos por esta zona se muestran en la figura 4. Las mezclas enzimáticas de la presente invención tienen una actividad mayor que las descritas en la técnica anterior. Las zonas 1, 2 y 3 de las figuras despliegan los incrementos de actividad de 10% o más en comparación con la Mezcla de Referencia. Las zonas 2 y 3 exhiben incremento de actividad de 13% o más en comparación con la Mezcla de Referencia. Las mezclas definidas por la zona 3 exhiben incrementos de 16% o más con respecto a la Mezcla de Referencia.

15 La forma irregular de la zona mapeada de las figuras 3A, 3B y 3C no fue prevista e indica declinaciones en el paso de la actividad dentro del espacio de mezcla completo. La mezcla de celulasa de la invención define un espacio que es más complicado que podría ser tenido en cuenta por el trabajo de la técnica anterior utilizando el modelo de sustrato o mezclas enzimáticas de menos de cuatro celulasas primarias.

20 Los esfuerzos pasados para optimizar mezclas empleaban típicamente mezclas ternarias representadas en una gráfica triangular (c.f. Baker et al., 1998). Tales esfuerzos caen en todas las esquinas, bordes o superficies del espacio, y por lo tanto están distantes del óptimo actual.

La presente invención será ilustrada adicionalmente en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Purificación de las celulasas primarias CBH1, CBH2, EG1 y EG2 de celulasa de *Trichoderma reesei*

25 Se cultivó una cepa de *Trichoderma reesei* en fermentación de líquido sumergida bajo condiciones que inducen la producción de celulasa tal como es conocido por los expertos en la técnica. La mezcla cruda de proteínas de *Trichoderma* fue secretada por las células hacia el caldo de fermentación. Las células fúngicas fueron retiradas del caldo de fermentación por filtración a través de una fibra de microfibra de vidrio que contiene un lecho de filtración Harbolite. Las celulasas primarias (CBH1, CBH2, EG1, EG2) fueron separadas del filtrado crudo por cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de DEAE-Sephrose tal como lo describe Bhikhabhai et al., (1984).
30 Esta etapa aísla EG1 y EG2. CBH1 y CBH2 fueron purificadas entonces posteriormente por cromatografía de afinidad con p-aminofenil-1-tio-β-D-celobiosido tal como lo reporta Piyachomkwan et al., (1997, 1998). Los componentes de celulasa purificados fueron concentrados y se hizo intercambio con regulador hacia citrato de sodio 50 mM, pH 5.0 utilizando una celda de ultrafiltración con agitación (Amicon) y una membrana de NMWL poliétersulfona de 10 kDa.

35 Ejemplo 2: Medición de la concentración y pureza de las celulasas primarias

Las concentraciones de proteína fueron determinadas químicamente utilizando el método de Bradford et al., (1976). Muestras de cada proteína purificada fueron separadas por SDS-PAGE y visualizadas post-electroforéticamente por tinción con azul de Commassie como se muestra en la figura 1, panel A. Para cada componente purificado, la intensidad de tinción de cada banda fue cuantificada por densitometría de barrido utilizando un sistema de imágenes Chemigenius2 (Syngene). Se calculó la pureza relativa dividiendo la intensidad de banda para cada componente por la intensidad de tinción total medida para todas las bandas en la misma línea del gel. La EG2 con carencia de un módulo de enlazamiento de carbohidratos estuvo presente en cantidades traza en la preparación de EG2 purificada pero no se consideró como un contaminante en esta preparación enzimática. La pureza relativa de CBH1 y CBH2 fue > 95% mientras que para EG1 y EG2 fue > 90%.

45 Para demostrar que cada preparación de componente estaba libre de celulasas primarias contaminantes, se analizaron CBH1, CBH2, EG1, EG2 purificadas por inmunoprecipitación Western utilizando antisuero policlonal específico para el componente de conejo (figura 1, panel B). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 100 V durante 1 hora utilizando una Mini Trans-Blot[®] Cell de BioRad. La inmunoprecipitación Western fue llevada a cabo utilizando el método de Birkett et al.
50 Los antisueros policlonales específicos para componente fueron generados utilizando péptidos sintéticos, cuyas secuencias estaban basadas en la secuencia primaria de aminoácido de CBH1, CBH2, EG1 o EG2 de *Trichoderma reesei*, como es conocido para los expertos en la técnica.

Estos ejemplos demostraron que los métodos de purificación usados produjeron CBH1, CBH2, EG1 y EG2 sustancialmente puras. Esto también demostró la especificidad de estos antisueros para cada uno de estos componentes de celulasa primarios.

5 **Ejemplo 3:** Determinación de las concentraciones relativas de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 en celulasa de Trichoderma

Las concentraciones relativas de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 en celulasa de Trichoderma reesei fueron determinadas por ELISA.

10 Se diluyeron celulasa y estándares de componentes purificados 1-100 µg/mL en solución salina regulada con fosfato, pH 7.2 (PBS) y se incubaron durante la noche a 4°C en placas de microtitulación (Costar EIA – Alto enlazamiento). Estas placas fueron lavadas con PBS que contenía 0.1% de Tween 20 (PBS/Tween) luego se incubaron en PBS que contenía 1% de albumina de suero bovino (PBS/BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pozos de microtitulación bloqueados fueron lavados con PBS/Tween. Se diluyeron antisueros policlonales de conejo específicos para CBH1, CHB2, EG1, y EG2 en PBS/BSA, se agregaron a placas de microtitulación separadas y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo anticonejo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se agregó tetrametil bencidina a cada placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

20 Se midió la absorbancia a 360 nm en cada pozo y se convirtió en concentración de proteína utilizando los estándares de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 desarrollados en el ejemplo 2. La concentración relativa de cada componente fue calculada dividiendo estas concentraciones de proteína por la concentración total de CBH1, CBH2, EG1 y EG2.

La composición relativa de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 en la celulasa de Trichoderma fue 57%:29%:7%:7%, respectivamente (figura 2). Esta será denominada aquí como nuestra Mezcla de Referencia. Esta Mezcla es un producto de celulasa comercial de Trichoderma y se mapea como sigue.

25 La concentración de CBH con respecto al conjunto completo de celulasas primarias (porcentaje de CBH) es $57\%+29\% = 86\%$. Esto coloca al conjunto en la figura 3D, la cual es de 85% a 95% de CBH. Las otras figuras son la figura 3A con porcentaje de CBH = 55% a 65%, figura 3B con porcentaje de CBH = 65% a 75% y figura 3C con porcentaje de CBH = 75% a 85%.

La concentración de CBH2 con respecto a todos los CBH (f_{C2}) es $29\%/(57\%+29\%) = 0.337$.

30 La concentración de EG2 con respecto a todos los EG primarios (f_{E2}) es $7\%/(7\%+7\%) = 0.5$.

La celulasa de las cepas de Trichoderma que no secretan CBH1 (nulas en CBH1), CBH2 (nulas en CBH2), EG1 (nulas en EG1) o EG2 (nulas en EG2) también fueron analizadas para demostrar que cada ELISA detecto específicamente CBH1, CBH2, EG1 o EG2 (figura 2).

35 **Ejemplo 4:** Medición de la actividad de hidrólisis de celulosa de mezclas primarias de celulasa sobre una materia prima lignocelulósica pretratada

40 Una mezcla de celulasas primarias con nuestras proporciones de referencia de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 del ejemplo 3 fueron comparadas con las mezclas con diferentes composiciones. Estas mezclas de celulasas primarias fueron probadas en un ensayo de hidrólisis de celulosa mixta de 0.25 mL. Las mezclas de celulasa fueron diluidas en regulador de citrato que contenía 0.5% de benzoato de sodio, complementado con una preparación de β-glucosidasa de Aspergillus niger y se incubaron con espigas de trigo pretratadas con ácido. El pretratamiento fue llevado a cabo como lo indica Foody, Patente de los Estados Unidos No. 4,461, 648. La incubación fue a 50°C durante 24 horas y el nivel de conversión de celulosa objetivo fue superior a 70%. La actividad enzimática fue calculada determinando la cantidad de enzima requerida para alcanzar el nivel de conversión de celulosa efectivo y normalizarlo hasta el requerido para la mezcla de celulasa de Referencia.

45 La incertidumbre de los valores normalizados es del orden de ± 0.04 , indicando que un valor de 10% por encima de lo observado para la referencia (esto es, un valor normalizado de 1.10) puede considerarse como significativamente superior a la referencia. Un promedio sopesado a través de un espacio de mezcla tridimensional (espacio con las dimensiones f_{C2} , f_{E2} y porcentaje de CBH) fue aplicado para suavizar los datos de actividad. Los datos de actividad normalizadoS para un punto dado (las coordenadas para este punto son $f_{C2} = x$, $f_{E2} = y$, $\%CBH = z$) fue promediado con sus puntos vecinos más cercanamente con las siguientes coordenadas: $x + 0.1$, y , z ; $x - 0.1$, y , z ; x , $y + 0.1$, z ; x , $y - 0.1$, z ; x , y , $z + 10\%$; y x , y , $z - 10\%$. Al punto en cuestión se le dio un peso $w = 1.00$ y los seis puntos vecino

ES 2 441 576 T3

recibieron cada uno un peso de $w = 0.15$ en la siguiente fórmula para el promedio pesado (x_w): $x_w = \sum w_i x_i / \sum w_i$ en donde el subscrito i denota una variable de recuento para sumar todos los siete puntos descritos anteriormente y x_i y w_i indican la actividad normalizada y el peso del punto i^o respectivamente.

5 Para representar estos resultados gráficamente, la actividad de la enzima se muestra en las figuras 3A, 3B, 3C, o 3D tal como se describe en el ejemplo 3 y se ilustra en la Tabla 1.

Tabla 1: Producción normalizada de glucosa por mezclas de celulasa primarias

Mezcla	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f_{C2}^{**}	f_{E2}^{***}	Actividad
Mezcla de Referencia	57%	29%	7%	7%	86%	3D	0.333	0.500	1.00
1	36%	23%	137%	14%	59%	3A	0.396	0.087	1.08
2	36%	23%	33%	8%	59%	3A	0.396	0.187	1.11
3	36%	23%	29%	12%	59%	3A	0.396	0.287	1.10
4	30%	29%	37%	4%	59%	3A	0.496	0.087	1.09
5	30%	29%	33%	8%	59%	3A	0.496	0.187	1.11
6	30%	29%	29%	12%	59%	3A	0.496	0.287	1.09
7	30%	29%	25%	16%	59%	3A	0.496	0.387	1.11
8	24%	35%	37%	4%	59%	3A	0.596	0.087	1.06
9	24%	35%	33%	8%	59%	3A	0.596	0.187	1.06
10	24%	35%	29%	12%	59%	3A	0.596	0.287	1.04
11	24%	35%	25%	16%	59%	3A	0.596	0.387	1.06
12	62%	7%	28%	3%	69%	3B	0.096	0.087	0.90
13	62%	7%	25%	6%	69%	3B	0.096	0.187	0.91
14	62%	7%	22%	9%	69%	3B	0.096	0.287	0.91
15	56%	14%	28%	3%	69%	3B	0.196	0.087	1.05
16	56%	14%	25%	6%	69%	3B	0.196	0.187	1.08
17	56%	14%	22%	9%	69%	3B	0.196	0.287	1.08
18	56%	14%	19%	12%	69%	3B	0.196	0.387	1.02
19	49%	20%	28%	3%	69%	3B	0.296	0.087	1.15
20	49%	20%	25%	6%	69%	3B	0.296	0.187	1.14
21	49%	20%	22%	9%	69%	3B	0.296	0.287	1.13

ES 2 441 576 T3

(continuación)

Mezcla	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f _{C2} **	f _{E2} ***	Actividad
22	49%	20%	19%	12%	69%	3B	0.296	0.387	1.08
23	49%	20%	16%	15%	69%	3B	0.296	0.487	1.08
24	49%	20%	13%	18%	69%	3B	0.296	0.587	1.06
25	42%	27%	28%	3%	69%	3B	0.396	0.087	1.14
26	42%	27%	25%	6%	69%	3B	0.396	0.187	1.14
27	42%	27%	22%	19%	69%	3B	0.396	0.287	1.13
28	42%	27%	19%	12%	69%	3B	0.396	0.387	1.13
29	42%	27%	16%	15%	69%	3B	0.396	0.487	1.14
30	42%	27%	13%	18%	69%	3B	0.396	0.587	1.06
31	42%	27%	10%	21%	69%	3B	0.396	0.687	1.05
32	35%	34%	28%	3%	69%	3B	0.496	0.087	1.11
33	35%	34%	25%	6%	69%	3B	0.496	0.187	1.16
34	35%	34%	22%	9%	69%	3B	0.496	0.287	1.17
35	35%	34%	19%	12%	69%	3B	0.496	0.387	1.17
36	35%	34%	16%	15%	69%	3B	0.496	0.487	1.18
37	35%	34%	13%	18%	69%	3B	0.496	0.587	1.12
38	35%	34%	10%	21%	69%	3B	0.496	0.687	1.07
39	28%	41%	28%	3%	69%	3B	0.596	0.087	1.11
40	28%	41%	25%	6%	69%	3B	0.596	0.187	1.14
41	28%	41%	22%	9%	69%	3B	0.596	0.287	1.14
42	28%	41%	19%	12%	69%	3B	0.596	0.387	1.16
43	28%	41%	16%	15%	69%	3B	0.596	0.487	1.15
44	28%	41%	13%	18%	69%	3B	0.596	0.587	1.11
45	28%	41%	10%	21%	69%	3B	0.596	0.687	1.07
46	21%	48%	28%	3%	69%	3B	0.696	0.087	1.07
47	21%	48%	25%	6%	69%	3B	0.696	0.187	1.11

ES 2 441 576 T3

(continuación)

Mezcla	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f _{c2} **	f _{E2} ***	Actividad
48	21%	48%	22%	9%	69%	3B	0.696	0.287	1.10
49	21%	48%	19%	12%	69%	3B	0.696	0.387	1.10
50	21%	48%	16%	15%	69%	3B	0.696	0.487	1.10
51	14%	55%	28%	3%	69%	3B	0.796	0.087	1.00
52	14%	55%	25%	6%	69%	3B	0.796	0.187	1.02
53	14%	55%	22%	9%	69%	3B	0.796	0.287	1.00
54	14%	55%	19%	12%	69%	3B	0.796	0.387	1.00
55	71%	8%	19%	2%	79%	3C	0.096	0.087	0.90
56	71%	8%	17%	4%	79%	3C	0.096	0.187	0.89
57	64%	15%	19%	2%	79%	3C	0.196	0.087	1.00
58	64%	15%	17%	4%	79%	3C	0.196	0.187	1.05
59	64%	15%	15%	6%	79%	3C	0.196	0.287	1.04
60	56%	23%	19%	2%	79%	3C	0.296	0.087	1.06
61	56%	23%	17%	4%	79%	3C	0.296	0.187	1.08
62	56%	23%	15%	6%	79%	3C	0.296	0.287	0.97
63	56%	23%	13%	8%	79%	3C	0.296	0.387	0.92
64	56%	23%	11%	10%	79%	3C	0.296	0.487	0.90
65	56%	23%	9%	12%	79%	3C	0.296	0.587	0.88
66	48%	31%	19%	2%	79%	3C	0.396	0.087	1.10
67	48%	31%	17%	4%	79%	3C	0.396	0.187	1.13
68	48%	31%	15%	6%	79%	3C	0.396	0.287	1.08
69	48%	31%	13%	8%	79%	3C	0.396	0.387	1.03
70	48%	31%	11%	10%	79%	3C	0.396	0.487	1.01
71	48%	31%	9%	12%	79%	3C	0.396	0.587	0.92
72	40%	39%	19%	2%	79%	3C	0.496	0.087	1.09
73	40%	39%	17%	4%	79%	3C	0.496	0.187	1.16

ES 2 441 576 T3

(continuación)

Mezcla	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f _{C2} **	f _{E2} ***	Actividad
74	40%	39%	15%	6%	79%	3C	0.496	0.287	1.15
75	40%	39%	13%	8%	79%	3C	0.496	0.387	1.13
76	40%	39%	11%	10%	79%	3C	0.496	0.487	1.14
77	40%	39%	9%	12%	79%	3C	0.496	0.587	1.10
78	32%	47%	19%	2%	79%	3C	0.596	0.087	1.08
79	32%	47%	17%	4%	79%	3C	0.596	0.187	1.15
80	32%	47%	15%	6%	79%	3C	0.596	0.287	1.10
81	32%	47%	13%	8%	79%	3C	0.596	0.387	1.04
82	32%	47%	11%	10%	79%	3C	0.596	0.487	1.03
83	32%	47%	9%	12%	79%	3C	0.596	0.587	1.01
84	24%	55%	19%	2%	79%	3C	0.696	0.087	1.00
85	24%	55%	17%	4%	79%	3C	0.696	0.187	1.06
86	24%	55%	15%	6%	79%	3C	0.696	0.287	1.06
87	16%	63%	19%	2%	79%	3C	0.796	0.087	0.95
88	16%	63%	17%	4%	79%	3C	0.796	0.187	0.94
89	16%	63%	15%	6%	79%	3C	0.796	0.287	0.98
90	63%	26%	10%	1%	89%	3D	0.296	0.087	0.92
91	63%	26%	9%	2%	89%	3D	0.296	0.187	0.96
92	63%	26%	8%	3%	89%	3D	0.296	0.287	0.92
93	54%	35%	10%	1%	89%	3D	0.396	0.087	0.96
94	54%	35%	9%	2%	89%	3D	0.396	0.187	1.06
95	54%	35%	8%	3%	89%	3D	0.396	0.287	1.00
96	45%	44%	10%	1%	89%	3D	0.496	0.087	1.02
97	45%	44%	9%	2%	89%	3D	0.496	0.187	1.07
98	45%	44%	8%	3%	89%	3D	0.496	0.287	1.05
99	45%	44%	7%	4%	89%	3D	0.496	0.387	0.97

(continuación)

Mezcla	% CBH1	% CBH2	% EG1	% EG2	% CBH*	Figura	f _{C2} **	f _{E2} ***	Actividad
100	36%	53%	10%	1%	89%	3D	0.596	0.087	1.07
101	36%	53%	9%	2%	89%	3D	0.596	0.187	1.08
102	36%	53%	8%	3%	89%	3D	0.596	0.287	0.98
103	36%	53%	7%	4%	89%	3D	0.596	0.387	0.93
104	27%	62%	10%	1%	89%	3D	0.696	0.087	0.86
105	27%	62%	9%	2%	89%	3D	0.696	0.187	0.90
106	27%	62%	8%	3%	89%	3D	0.696	0.287	0.91
*%CBH2 = %CBH1 + %CBH2 **f _{C2} = CBH2/(CBH1+CBH2) ***f _{E2} = EG2/(EG1+EG2)									

5 Estas gráficas se muestran representando mezclas de celulosa que tienen contenidos de CBH fraccionados (% de CBH) dentro de los siguientes rangos: 55-65w (figura 3A), 65-75% (figura 3B), 75-85% (figura 3C) y 85-95% (figura 3D).

10 Las áreas sombreadas en las figuras 3A, 3B y 3C representan las actividades de hidrólisis relativas para mezclas con actividad significativamente superior a la de la Mezcla de Referencia. Esta actividad es 1.10-1.12 en la zona 1, la cual es una actividad 10% a 12% más alta que la Mezcla de Referencia. La actividad es 1.13-1.15 en la zona 2. Esta es una actividad de 13% a 15% más alta que la Mezcla de Referencia. La actividad más alta de 1.16-1.18 está en la zona 3, la cual es 16% a 18% más alta que la Mezcla de Referencia. La figura 3A que abarca de 55% a 65% de CBH, no tiene mezclas con actividades por encima de 1.12 y por lo tanto solamente incluye valores dentro de la zona 1. La figura 3D que abarca 85% a 95% de CBH no tiene ninguna mezcla con actividad por encima de 1.10%.

15 Hay varios aspectos interesantes con respecto a los resultados mostrados en las figuras 3A, 3B, 3C y 3D. Primero, hay mezclas de celulasas primarias identificadas con actividad significativamente más alta que la Mezcla de Referencia, lo cual por si mismo representa las proporciones de celulasas primarias encontradas en enzimas de celulasa típicas disponibles comercialmente. Esto muestra que es posible producir mezclas de celulosa que son > 15% más potentes que las mezclas disponibles actualmente. Estas mezclas difieren significativamente en composición de la Mezcla de Referencia.

20 Un segundo punto es la forma irregular de las zonas mapeadas. Estas formas irregulares no fueron previstas e indican declinaciones en la actividad en los pasos dentro del espacio de la mezcla completa. Los datos experimentales definen un espacio que es más complicado que podría ser tenido en cuenta para el trabajo previo utilizando sustratos modelo o mezclas de enzimas de menos de cuatro celulasas primarias.

25 Un tercer punto es que las mejores mezclas son composiciones significativamente diferentes de las mezclas de la técnica anterior (véase ejemplo 5). Sin limitarse por la teoría, consideramos que es necesario utilizar una materia prima lignocelulósica pretratada para la medición de la actividad de celulasa. Muchos estudios de la técnica anterior utilizan sustratos modelo de celulosa pura.

En la figura 4 se muestran representaciones tridimensionales del espacio de mezcla de componentes compuestos de estas zonas.

Ejemplo 5: Composiciones de mapeo de celulasas de Trichoderma

30 Las composiciones relativas de diez celulasas de Trichoderma para hidrólisis de celulosa a partir de la literatura científica y de patentes fueron determinadas dividiendo la concentración de proteína reportada de CBH1, CBH2,

5 EG1 y EG2 por la de la suma de los cuatro componentes en cada celulasa respectiva. Estas celulasas fueron entonces divididas en grupos con base en su porcentaje de CBH tal como se hizo para las mezclas de celulasa primarias del ejemplo 4. Estas celulasas fueron representadas en gráficas entonces como función de sus f_{C2} y f_{E2} y subsecuentemente se compararon con las zonas asociadas con un mejoramiento en la actividad de hidrólisis de celulosa con respecto a la mezcla de componentes de referencia. Las celulasas de Trichoderma en la literatura con $CBH < 55\%$ o $CBH > 95\%$ no fueron incluidas en este análisis.

Todas las composiciones publicadas de celulasas primarias caen bien por fuera de las zonas que produjeron la actividad más alta de celulasa.

Tabla 2: Mapeo de composiciones conocidas en la figura 3

Mezcla	CBH1(%)	CBH2(%)	EG1(%)	EG2(%)	(%)CBH	Figura	f_{C2}	f_{E2}
Baker et al.(1998)	60	20	20	0	80	3C	0.25	0
Citolasa (en Patente U.S. No. 5,525,507)	50	14	12	9	75	3C	0.22	0.43
Henrissat et al. (1985)	0	95	5	0	95	3D	1	0
Henrissat et al. (1985)	0	95	0	5	95	3D	1	1
Jeoh et al. (2006)	0	70	0	30	1	3B	1	1
Celoviridina (en Markov et al., 2005)	50	30	10	10	80	3C	0.38	0.5
Nidetsky et al. (1994)	88.6	0	11.4	0	88.6	3D	0	0
Valjamae et al. (2003)	90.9	0	0	9.1	90.9	3D	0	1
Woodward et al. (1988)	50	25	0	25	75	3B	0.33	1
Woodward et al. (1988)	88	0	0	12	88	3D	0	1

10 También se mapeó una celulasa de Trichoderma que carece de EG2 en la figura 3D. Esta composición contenía 61.3% de CBH1, 31.2% de CBH2, 7.5% de EG1 y los valores f_{C2} y f_{E2} fueron 0.337 y 0, respectivamente. Esta composición también cae por fuera de las zonas que producen la actividad de celulasa más alta (véase figuras 3B y 3C).

15 **Ejemplo 6:** Medición de la actividad de hidrólisis de mezclas de celulasas primarias sobre materias primas lignocelulósicas pretratadas durante un periodo extendido.

20 Una mezcla de celulasas primarias con nuestras proporciones de referencia de CBH1, CBH2, EG1 y EG2 del ejemplo 3 fueron comparadas con una mezcla mejorada con un 15% de mejora en la actividad del ejemplo 4 en una hidrólisis extendida. La mezcla mejorada estaba compuesta de 32% de Cel7A, 47% de Cel6A, 17% de Cel7B y 4% de cel5A. Ambas muestras fueron dosificadas a 18 mg de enzima por gramo de celulasa y suplementadas adicionalmente con una preparación de β -glucosidasa de *Aspergillus niger* a 100 IU/g de celulosa.

25 Las mezclas fueron incubadas con 25 g/L de celulosa en citrato 50 mM, pH 5.0, que contenía 0,5% de benzoato de sodio y 0.01% de Triton X-100 a 50°C durante 56 horas con agitación continua a 200 rpm. Se tomaron alícuotas de 0.5 mL en los puntos de tiempo indicados en la figura 5 y la concentración de glucosa en la porción soluble fue probada y convertida en una conversión fraccionada. Los datos de conversión fueron ajustados entonces con una hipérbola rectangular con un término lineal adicional utilizando minimización de la suma de los residuales cuadrados de ajustes. La ecuación fue de la siguiente forma: $conversión = (max * tiempo) / (mediomax + tiempo) + c * tiempo$. Ambos conjuntos de datos fueron ajustados globalmente con valores únicos de max y mediomax y un valor compartido de la variable c. Los errores estándar de los valores de conversión max fueron calculados utilizando una metodología de comparación modelo (Motulsky y Christopolous, 2003). Se utilizó una prueba t para comparar los valores de conversión max para las mezclas de referencia y optimizada (supra).

El valor de conversión max para la mezcla optimizada fue 0.69, un incremento sobre la conversión max de 0.59 de la mezcla de referencia. Esto representa un incremento significativo ($P < 0.05$) de 16%. La conversión de estas mezclas será más alta en la presencia de componentes adicionales de la celulosa aparte de los cuatro considerados aquí.

- 5 La presente invención ha sido descrita con respecto a una o más realizaciones. Sin embargo, será evidente para personas experimentadas en la técnica que puede realizarse un cierto número de variaciones y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Referencias

- 10 Baker, J., et al., "Hydrolysis of cellulose using ternary mixtures of purified cellulases", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72:395-403, (1998).
- Barr, B., et al., "Identification of two functionally different classes of exocellulases", *Biochemistry*, 35:586-592, (1996).
- Berghem, L. and Pettersson, L., "The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose.", *European Journal of Biochemistry*, 37:21-30,(1973).
- 15 Bhikhabhai, R., et al., "Isolation of Cellulolytic Enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414", *Journal of Applied Biochemistry*, 6:336-345 (1984).
- Birkett, C.R., et al., "Use of monoclonal antibodies to analyze the expression of a multi-tubulin family", *FEBS Letters*, 187(2):211-218, (1985).
- 20 Boisset, C., et al., "Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose", *Biotechnology and Bioengineering*, 72:339-345, (2001).
- Bradford, M.M., et al., "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, (1976).
- Enari, T.M. and Niku-Paavola, M.L., "Assays for Cellulolytic Enzymes: Methods for Measuring Cellulase Activities", In J.N. Abelson and M.I. Simon (Ed/s.), *Methods in Enzymology*, 117-126, San Diego, California: Academic Press, Inc., (1988).
- 25 Henrissat, B., et al., "Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose", *Bio/Technology*, 3:722-726, (1985).
- Houghton, J., et al., "Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol", U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, DOE/SC-0095, (2006).
- 30 Hui, J., et al., "Characterization of cellobiohydrolase I (Cel7A) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry", *Journal of Chromatography B*, 752:349-368,(2001).
- Irwin, D., et al., "Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects", *Biotechnology and Bioengineering*, 42:1002-1013, (1993).
- 35 Kim et al., "Factorial optimization of a six-cellulase mixture", *Biotechnology and Bioengineering*, 58:494-501, (1998).
- Kubicek, C., "The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 45:2-22, (1992).
- Motulsky, H, and Christopolous, A., "Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting." Oxford University Press, New York, (2004).
- 40 Nidetsky, B., et al., "Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction.", *Biochemical Journal*, 298:705-710, (1994).
- Öhgren, K., et al., "Optimization of Steam Pretreatment of SO₂-Impregnated Corn Leña for Fuel Ethanol Production", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124:1055-1067, (2005)

- Piyachomkwan, K., et al., "p-Aminophenyl 1-thio- β -D-cellobioside: synthesis and application in affinity chromatography of exo-type cellulases", *Carbohydrate Research*, 303:255-259, (1997).
- Piyachomkwan, K., et al., "Aryl Thioglycoside-Based Affinity Purification of Exo-Acting Cellulases", *Analytical Biochemistry*, 255:223-235, (1998).
- 5 Sheehan, J. and Himmel, M., "Enzymes, Energy, and the Environment: A Strategic Perspective on the U.S. Department of Energy's Research and Development Activities for Bioethanol", *Biotechnology Progress*, 15:817-827, (1999).
- Tolan, J., "logen's process for producing ethanol from cellulosic biomass", *Clean Technologies and Environmental Policy*, 3:339-345, (2002).
- 10 Walker, L., et al., "Engineering cellulase mixtures by varying the mole fraction of *Thermonospora fusca* E5 and E3, *Trichoderma reesei* CBHI and *Caldocellum saccharolyticum* β -glucosidase", *Biotechnology and Bioengineering*, 42:1019-1028, (1993).
- Weil, J. et al., "Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 68(1-2):21-40 (1997).
- 15 Wood, T. and McCrae, S., "The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase", *Biochemical Journal*, 171:61-72, (1972).
- Wood, T. and McCrae, S., "Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose", *Advances in Chemistry Series*, 181:181-209, (1979).
- 20 Wood, T., et al., "The mechanism of fungal cellulase action: Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose", *Biochemical Journal*, 260:37-43.
- Woodward, J., et al., "The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose", *Biochemical Journal*, 255:895-899, (1988).
- 25 Zhang, S., et al., "Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis", *Biotechnology and Bioengineering*, 66:35-41, (1999).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para hidrólisis enzimática de una materia prima lignocelulósica pretratada hasta azúcares solubles, comprendiendo el proceso la adición de una mezcla de enzimas celulasa a la materia prima lignocelulósica pretratada, comprendiendo dicha mezcla de enzimas celulasa una mezcla de celulasas primarias de celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 y endoglucanasas EG1 y EG2, estando presentes dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 a más de o igual a 55% y menos de 85% de la mezcla de celulasas primarias en peso, estando presente dicha CBH2 a una fracción en peso con respecto a la celobiohidrolasa CBH1 y CBH2 tal como lo define f_{C2} y estando presente dicha EG2 a una fracción en peso con respecto a las endoglucanasas EG1 y EG2 tal como lo define f_{E2} , en donde
- 5
- 10 cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o igual a 55% y menos de 65% de las celulasas primarias en peso,
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.35;
- 15 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25; o
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45,
- cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o iguales a 65% y menores de 75% de las celulasas primarias en peso,
- 20 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.25 y menores de 0.35 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.35;
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.55;
- 25 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.65; o
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.65 y menores de 0.75 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55,
- cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o iguales a 75% y menores de 85% de las celulasas primarias en peso,
- 30 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.25;
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.65; o
- 35 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.35
- y en donde las celulasas primarias son de una fuente fúngica.
2. El proceso de la reivindicación 1 en donde dicha celobiohidrolasa CBH1 y CBH2 están presentes a 75% hasta 85% de las celulasas primarias en peso y
- 40 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25;
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55; o

- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25.
3. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha celobiohidrolasa CBH1 y CBH2 están presentes a 65% hasta 75% de las celulasas primarias en peso,
- 5 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.25 y menores de 0.35 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.35;
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.55; o
- 10 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55.
4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las celulasas primarias son de *Trichoderma reesei*.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las celulasas primarias son obtenidas a partir de un microorganismo que expresa secuencias de codificación que son endógenas o heterólogas para dicho microorganismo.
- 15 6. El proceso de la reivindicación 5, en donde las celulasas primarias son obtenidas a partir de *Trichoderma reesei*.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la hidrólisis enzimática convierte al menos aproximadamente 80% de la celulosa en la materia prima lignocelulósica pretratada en azúcares solubles.
- 20 8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la hidrólisis enzimática se lleva a cabo con enzimas de celulasa que comprenden β -glucosidasa y un secretoma de *Trichoderma reesei*.
9. Una mezcla de enzimas de celulasa que comprende una mezcla de celulasas primarias de celobiohidrolasa CBH1 y CBH2 y endoglucanasas EG1 y EG2, estando presentes dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 a más de o igual a 55% y menos de 85% de la mezcla de celulasa primaria en peso, estando presente dicha CBH2 en una fracción en peso relativa a la celobiohidrolasa CBH1 y CBH2 tal como lo define f_{C2} y estando presente dicha EG2 en una fracción en peso relativa a las endoglucanasas EG1 y EG2 tal como lo define f_{E2} , en donde
- 25 cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o iguales a 55% y menores de 65% de las celulasas primarias en peso,
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.35;
- 30 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25; o
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45,
- 35 when said CBH1 and CBH2 celobiohidrolasas están presentes por encima de o iguales a 65% y menores de 75% de las celulasas primarias en peso,
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.25 y menores de 0.35 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.35;
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.55;
- 40 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.65; o
- dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.65 y menores de 0.75 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55,

ES 2 441 576 T3

cuando dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes por encima de o iguales a 75% y menores de 85% de las celulasas primarias en peso,

dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.25;

5 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.65; o

dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.35

y en donde las celulasas primarias son de una fuente fúngica.

10 10. La mezcla de enzimas de celulasa de la reivindicación 9, en donde dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes a 75% hasta 85% de las celulasas primarias en peso y

dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25;

15 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55; o

dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25.

11. La mezcla de enzimas de celulasa de la reivindicación 10, en donde dichos valores f_{C2} son superiores o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.25.

20 12. La mezcla de enzimas de celulasa de la reivindicación 9, en donde dichas celobiohidrolasas CBH1 y CBH2 están presentes a 65% hasta 75% de las celulasas primarias en peso y

dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.25 y menores de 0.35 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.35;

25 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.05 y menores de 0.55; o

dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55.

13. La mezcla de enzimas de celulasa de la reivindicación 12, en donde

30 dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.45 y menores de 0.55 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.15 y menores de 0.55; o

dichos valores f_{C2} son superiores a o iguales a 0.55 y menores de 0.65 y dichos valores f_{E2} son superiores a o iguales a 0.35 y menores de 0.45.

35 14. La mezcla de enzimas de celulasa de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde la mezcla de enzimas de celulasa es producida expresando las celulasas primarias a partir de un microorganismo a valores de pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5.

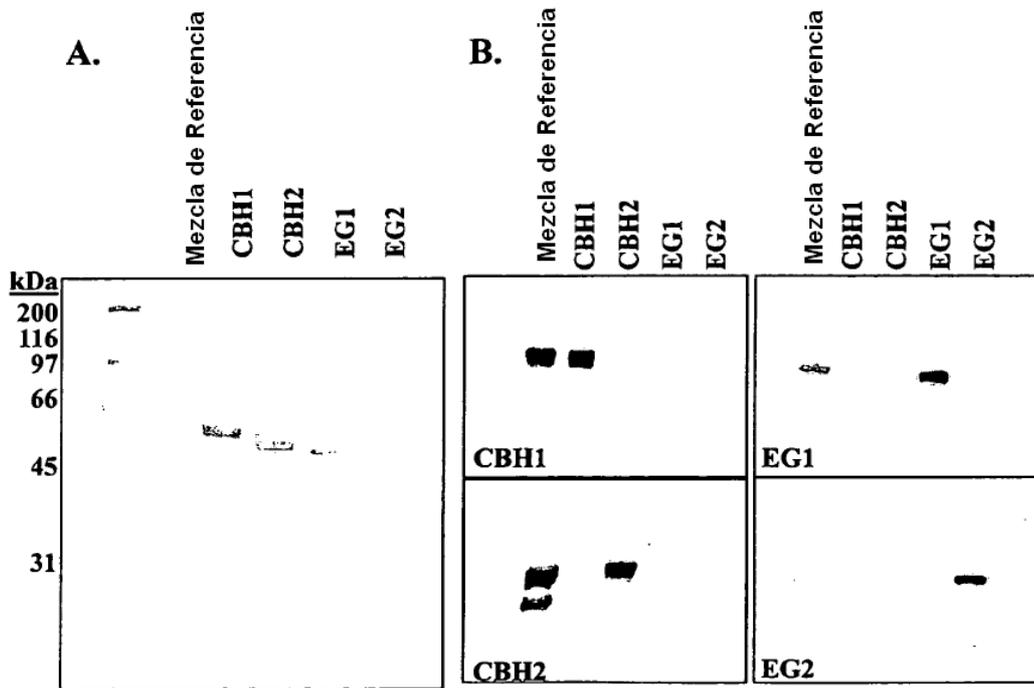


Figura 1

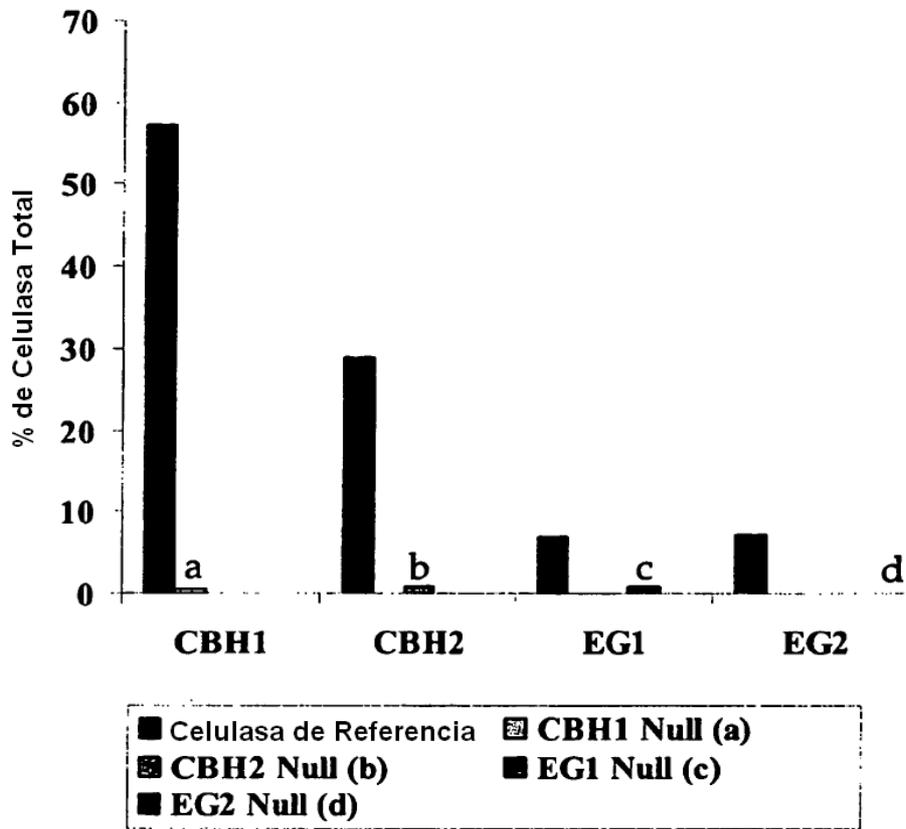


Figura 2

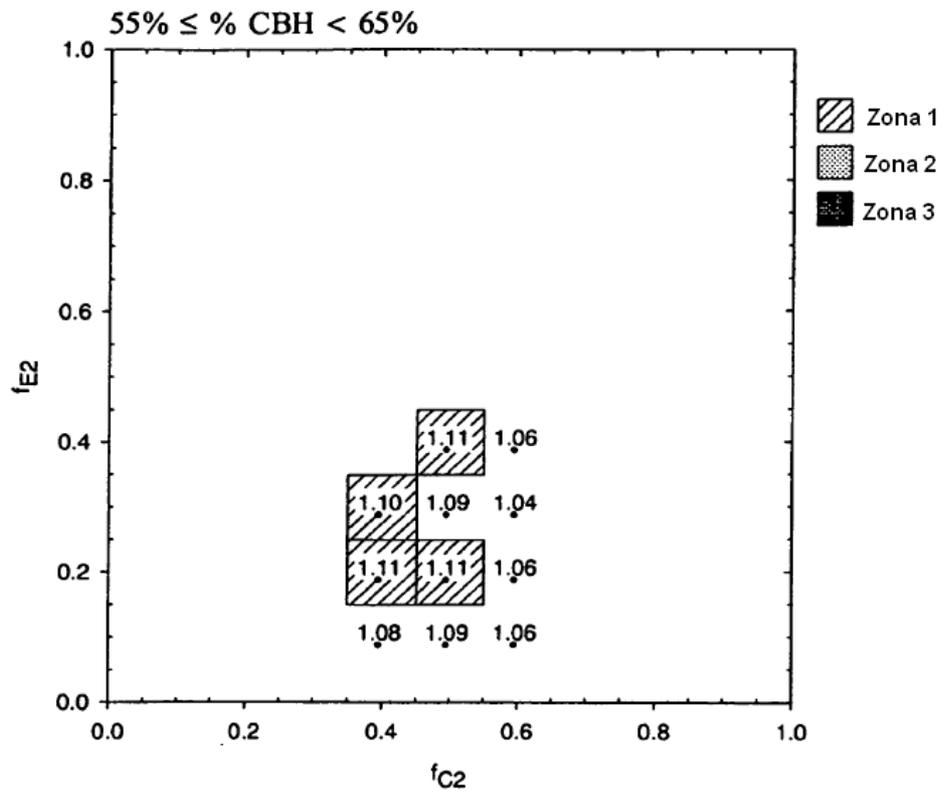


Figura 3A

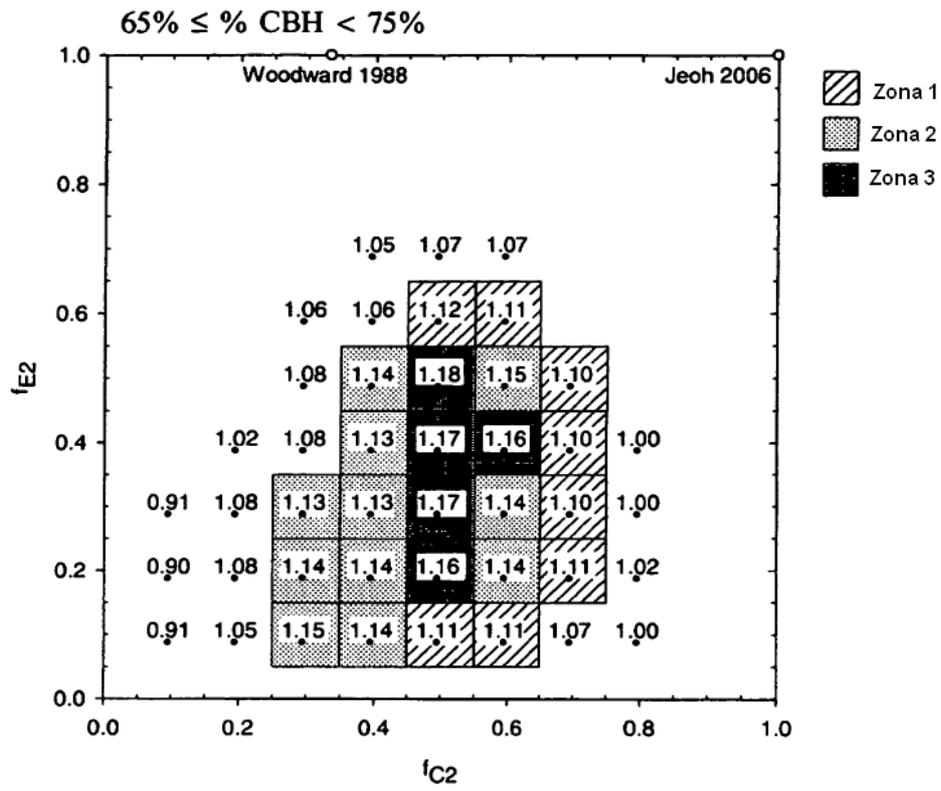


Figura 3B

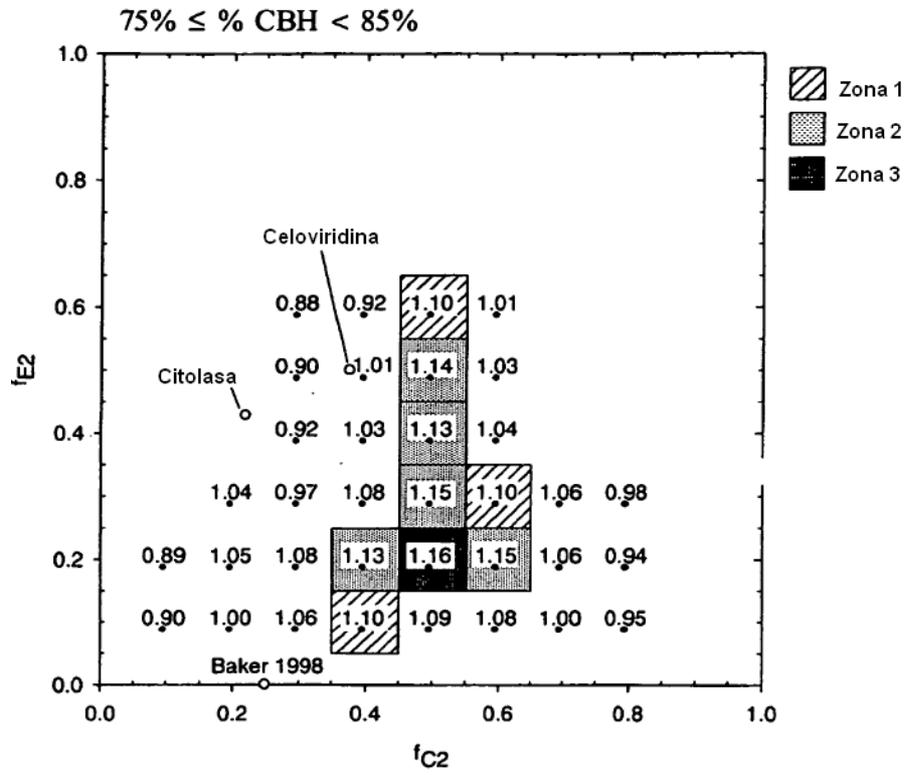


Figura 3C

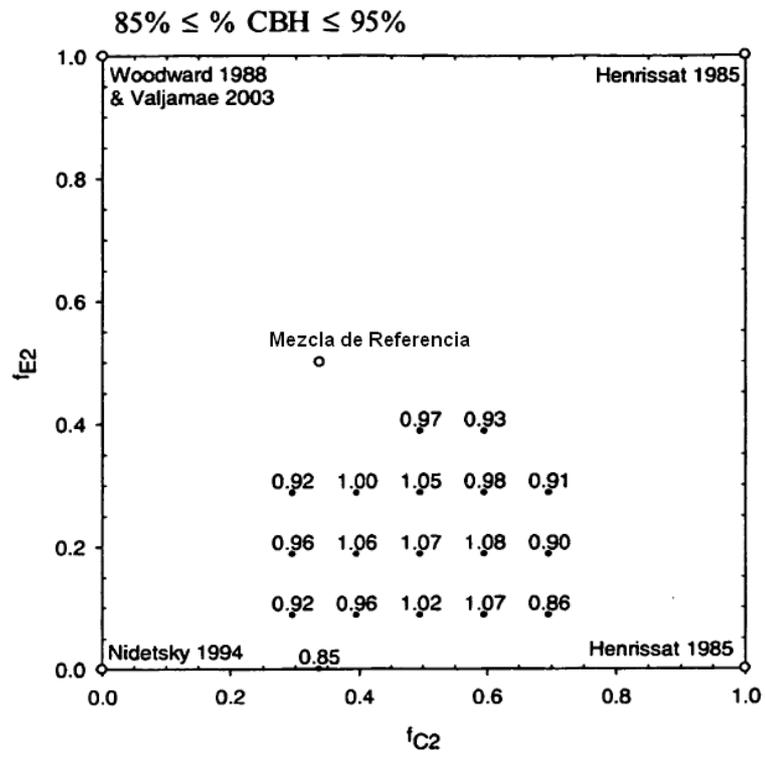


Figura 3D

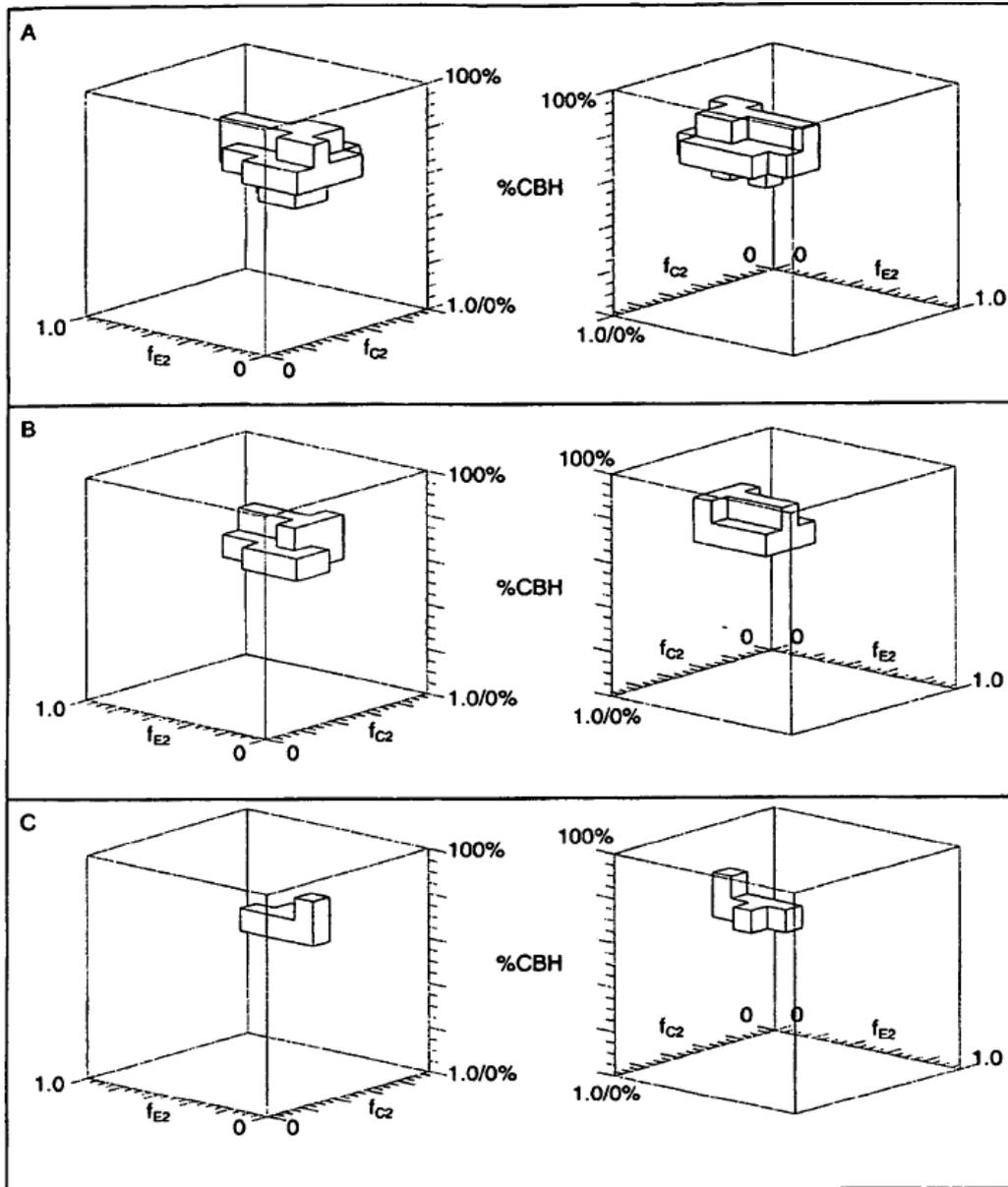


Figura 4

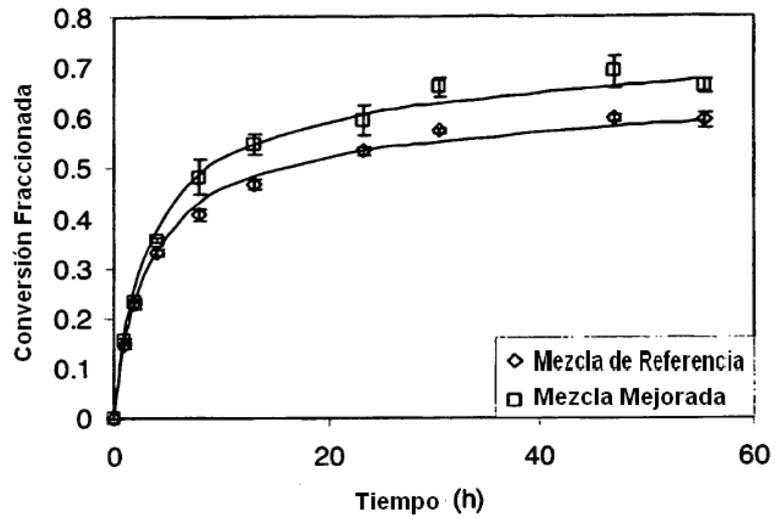


Figura 5