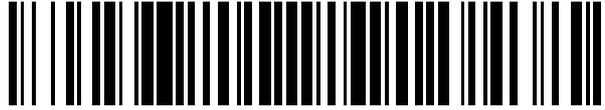


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 241**

51 Int. Cl.:

C12N 1/22 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2007 E 07863106 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2099899**

54 Título: **Acondicionamiento de biomasa para crecimiento microbiano**

30 Prioridad:

03.01.2007 US 878616 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2014

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304 , US**

72 Inventor/es:

**BODIE, ELIZABETH A. y
ENGLAND, GEORGE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 523 241 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

Acondicionamiento de biomasa para crecimiento microbiano

5 **2. INTRODUCCIÓN**

La invención se refiere a un método para mejorar el rendimiento de procesos microbianos que utilizan biomasa lignocelulósica como fuentes de nutrientes.

10 **3. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

En los últimos años, se han logrado avances considerables en la conversión de biomasa en etanol como combustible. La mayor parte del etanol producido a partir de biomasa hasta ahora está basada en la fermentación de glucosa de maíz en los Estados Unidos y sacarosa de caña de azúcar en Brasil. La biomasa, que está constituida en gran parte por celulosa, hemicelulosa y lignina ha atraído una atención creciente como fuente importante de energía renovable. Los residuos de silvicultura y agricultura son abundantes y relativamente económicos. Si este material, o al menos una parte importante del mismo, pudiera convertirse en combustible líquido, esto podría constituir una contribución importante a la resolución del problema del reciclamiento y la conservación de los recursos.

20 Puede producirse etanol a partir de materiales lignocelulósicos, tales como madera y residuos de cosechas. Los componentes de celulosa y hemicelulosa de la lignocelulosa pueden hidrolizarse para liberar monosacáridos que se fermentan luego a etanol. No obstante, ha sido difícil desarrollar un proceso económicamente viable de conversión del material celulósico en azúcares fermentables. La investigación en el uso de biomasa lignocelulósica para fabricar etanol y otros productos ha sido revisada extensamente, véase por ejemplo Lin y Tanaka (2006 Appl. Microbiol. Biotechnol. 69:627-642) y Saha (2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30:279-291).

30 La lignocelulosa es un sustrato más complejo que el almidón y los azúcares. Una de las tareas limitantes de la velocidad y difíciles es la separación de la lignina. Además, los tejidos vegetales difieren enormemente con respecto a tamaño y organización. Algunos tipos de células vegetales tienen paredes celulares gruesas y una lámina media fuertemente lignificada que separa una células de otras. Estas paredes celulares tienen que ser atacadas desde la superficie luminal hacia fuera a través de la pared secundaria (en oposición a las partículas de celulosa pura, que se degradan desde el exterior hacia dentro). Además, las limitaciones impuestas por la estructura de la celulosa propiamente dicha, limitaciones adicionales son impuestas por la difusión y el transporte del agente celulolítico al sitio de ataque. Así, antes de la hidrólisis de la celulosa, la mayoría de los materiales leñosos se someten a un pretratamiento para hacer las fibras de celulosa contenidas en el interior de las estructuras más sensibles y accesibles a la hidrólisis.

40 Se ha observado que la fermentación de los hidrolizados derivados de la madera a etanol se ve dificultada por la presencia de sustancias inhibitoras, tales como furanos, ácidos orgánicos y diversos compuestos fenólicos. Tales compuestos inhibidores se forman o se liberan durante la degradación de la lignina y hidrólisis de polisacáridos complejos existentes en la madera. La clase de compuestos tóxicos y su concentración en los hidrolizados de lignocelulosa dependen tanto de la materia prima como de las condiciones de operación empleadas para la hidrólisis. Tales compuestos tóxicos pueden reducir significativamente la utilización eficiente de los azúcares y la producción de etanol.

45 Cierta número de métodos de destoxificación biológicos, físicos y químicos han sido testados con hidrolizados de biomasa de píceas (Larsson et al., 1999, Appl. Biochem. Biotechnol. 77-79, 99-103). U.S. 7.067.303 da a conocer el uso del hongo *Coniochaeta ligniaria* para destruir los furanos contenidos en los hidrolizados. Un método utilizado corrientemente, conocido como "sobrecalentado" implica el ajuste del pH inicialmente a 10-11 con un álcali, v.g. hidróxido de calcio o amoníaco y luego a 5,0-6,0 con un ácido, v.g. ácido sulfúrico o fosfórico. Las condiciones utilizadas para la destoxificación con álcali tienen que controlarse cuidadosamente a fin de optimizar los efectos positivos y minimizar la degradación de los azúcares fermentables. Los mecanismos que subyacen tras el efecto de destoxificación con álcali y la influencia de la elección del catión y las condiciones no son bien conocidos. (Nilvebrant et al. 2003, Appl. Biochem. Biotechnol. 105 -108:615-28; Persson et al., 2002, J Agric Food Chem. 50(19):5318-25). Si bien el sobrecalentado es muy eficaz, conduce a un precipitado insoluble que persiste a través de los pasos subsiguientes y tiene que eliminarse y desecharse, dando como resultado desechos y coste incrementado.

60 La eficacia de un método de destoxificación es variable debido que cada tipo de hidrolizado tiene un grado de toxicidad diferente, y cada especie o incluso cada cepa de microorganismo tiene un grado diferente de tolerancia a los inhibidores. Por tanto, los diferentes métodos de destoxificación no pueden compararse estrictamente cuando se utilizan hidrolizados de fuentes distintas y microorganismos diferentes. (Mussatto y Roberto, 2004, Bioresour. Technol. 93(1):1-10; Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000, Bioresour. Technol. 74:25-33; Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000, Bioresour. Technol. 74:17-24).

65 Larsson et al., 1999, Appl. Biochem. Biotechnol. 77-79: 91-103 da a conocer métodos para destoxificación de

biomasa lignocelulósica tratada con ácidos con fenoloxidasa, lacasa y *Trichoderma reesei* para la producción de etanol.

5 Bigelow et al., 2002, Appl. Biochem. Biotechnol. 98-100: 921-34 da a conocer la producción de celulosa por *Trichoderma reesei* en bagazo pretratado con agua caliente.

10 Si bien el foco de gran parte de la investigaciones está dirigido a la destoxificación de hidrolizados de madera para fermentación etanólica, el uso de biomasa lignocelulósica como material de alimentación para otros procesos biotecnológicos está relativamente inexplorado. Por ejemplo, debido a la creciente demanda de enzimas celulasa en una diversidad de industrias, existe claramente necesidad de nuevos métodos para aumentar la producción de celulasas a partir de hongos, v.g., *Trichoderma reesei* a fin de que las enzimas celulasa puedan ser disponibles de modo más económico.

15 Incluso dentro del contexto de la generación de etanol, existe una necesidad urgente de mejora en la economía y eficiencia de los diversos enfoques diferentes en la conversión de lignocelulosa en azúcares para etanol.

4. SUMARIO DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere a métodos para mejorar el rendimiento de procesos microbianos que utiliza biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido como fuente de nutrientes. En particular, la invención proporciona métodos, como se definen en las reivindicaciones, para preparación de una composición que comprende biomasa lignocelulósica que está acondicionada para crecimiento microbiano. Una composición de este tipo puede utilizarse como componente en un material de alimentación para un proceso microbiano. Los métodos comprenden poner en contacto una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido con una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles durante un periodo de tiempo suficiente para neutralizar los compuestos inhibidores presentes en la composición. La composición acondicionada puede soportar una tasa de crecimiento de una especie de microorganismo de producción que es mayor que la que puede obtenerse con una composición de biomasa lignocelulósica que no se había puesto en contacto con la composición enzimática. En una realización, la composición enzimática comprende una lacasa. En una realización, la biomasa lignocelulósica se deriva de plantas no leñosas, tales como maíz y/o caña de azúcar. En una realización, la composición enzimática comprende una lacasa y la biomasa lignocelulósica se selecciona de forraje de maíz y bagazo de caña de azúcar.

35 La invención abarca también métodos como se definen en las reivindicaciones, para cultivo de microorganismos que son sensibles a ciertos compuestos inhibidores presentes en la biomasa lignocelulósica. En una realización, una composición que comprende una biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido se pone en contacto con una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles durante un periodo de tiempo suficiente para acondicionar la composición para crecimiento microbiano. La composición acondicionada se utiliza luego como un componente de la alimentación para cultivar los microorganismos. Alternativamente, la composición enzimática se añade directamente a un proceso en el que los microorganismos se cultivan en un medio de cultivo que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido. En cualquier caso, la tasa de crecimiento de los microorganismos y/o el rendimiento de biomasa microbiana en la composición acondicionada está incrementado con relación al de una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no estuvo en contacto con dicha composición enzimática.

45 La invención abarca adicionalmente métodos, como se definen en las reivindicaciones, para fabricar un producto en un microorganismo que utiliza biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido como fuente de nutrientes. Los métodos implican generalmente cultivar los microorganismos que dan lugar al producto en una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido, y está acondicionada para crecimiento microbiano. El producto puede recuperarse de los microorganismos y/o la composición acondicionada. Como se ha descrito arriba, la composición se acondiciona por tratamiento con una enzima oxidante de los fenoles de tal modo que la tasa de crecimiento de los microorganismos que puede obtenerse a partir de la composición acondicionada se incrementa con relación a la de una composición sin acondicionamiento. En ciertas realizaciones, el microorganismo cultivado es una especie *Trichoderma* y el producto es una enzima.

55 5. DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

60 Figura 1. Crecimiento de cultivos tratados con lacasa. El gráfico muestra el consumo de glucosa por un cultivo en crecimiento de *Trichoderma reesei* a lo largo de un periodo de 3 días en un medio de cultivo que comprendida inicialmente 2% de forraje de maíz y 10 g glucosa/litro. Las concentraciones de glucosa de diversos cultivos que utilizaban medios de cultivo tratados con las concentraciones indicadas (0 U/ml, 0,125 U/ml, 0,25 U/ml, 0,5 U/ml) de lacasa de *Trichoderma piluliferum* durante el número de días indicado (1, 2, 3 días) se muestran por líneas y símbolos de leyenda diferentes. El cultivo de control no se trató con lacasa (0 U/ml).

6. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención aborda el problema de las sustancias inhibitoras en la biomasa lignocelulósica que pueden afectar desfavorablemente a la eficiencia de los cultivos microbianos que utilizan biomasa lignocelulósica como fuente de nutrientes. La presente invención se refiere a métodos, como se definen en las reivindicaciones, para mejorar la utilidad de la biomasa lignocelulósica que no se ha sometido a pretratamiento ácido como fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos en diversos tipos de procesos.

La invención implica el tratamiento o acondicionamiento de una biomasa lignocelulósica como se define más adelante que no ha sido sometida a pretratamiento ácido con una composición enzimática que comprende una o más enzimas oxidantes de los fenoles. Sin pretender quedar ligados por ninguna teoría o mecanismo, algunos de los inhibidores son compuestos fenólicos liberados durante la descomposición de la lignina, y se cree que las enzimas oxidantes de los fenoles de la invención catalizan el acoplamiento oxidante de tales compuestos fenólicos para formar compuestos polímeros insolubles. El uso de enzimas oxidantes de los fenoles en la presente invención es distinto de la utilización de enzimas oxidantes de los fenoles como agente destoxificante a fin de ayudar a la descomposición de la biomasa por otras enzimas. El beneficio proporcionado por la presente invención es un crecimiento microbiano aumentado.

Después del contacto con la composición enzimática de la invención, la lignocelulosa acondicionada para crecimiento microbiano puede utilizarse directamente en un proceso microbiano o someterse a manipulaciones posteriores. El tratamiento con la composición enzimática de la invención puede aminorar los problemas de viabilidad reducida y/o crecimiento lento de los microorganismos de producción y rendimiento reducido cuando se utiliza biomasa lignocelulósica como componente de un material de alimentación. En comparación con el sobreencalado, cuando se utiliza el método de la invención se produce poco o nada de desechos.

Se considera que la composición enzimática puede utilizarse para acondicionar lignocelulosa sin pretratar así como lignocelulosa pretratada que no se ha sometido a pretratamiento ácido. Como se describe en detalle en la Sección 6.1, puede utilizarse en la invención una gama extensa de lignocelulosas sin tratar. La composición enzimática de la invención puede utilizarse ventajosamente para reducir la duración del paso de pretratamiento o incluso eludir el paso de pretratamiento. El término biomasa lignocelulósica incluye materiales que contienen lignocelulosa tanto sin tratar como pretratados que no han sido sometidos a pretratamiento ácido. Una lignocelulosa pretratada que no ha sido sometida a pretratamiento ácido puede utilizarse también en la invención. En particular, la invención proporciona el uso de una enzima oxidante de los fenoles para acondicionar una biomasa lignocelulósica no leñosa, como se define en las reivindicaciones, tal que la biomasa acondicionada es más adecuada para sostener el crecimiento de microorganismos. En ciertos aspectos de la invención, se excluye el uso de lacasa purificada y lignin-peroxidasa purificada aislada del hongo de la pudrición blanca (*Trametes versicolor*) a fin de tratar hidrolizado de madera para fermentación etanólica.

El tratamiento de biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido con la composición enzimática se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficiente para reducir la concentración de compuestos fenólicos inhibitorios en la biomasa lignocelulósica. El tratamiento puede llevarse a cabo por separado de los pasos del proceso subsiguientes. En una realización, el tratamiento de la biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido con la composición enzimática puede conducirse simultáneamente con el crecimiento de microorganismos de producción. En otra realización de la invención, el tratamiento se lleva a cabo antes de la introducción de los microorganismos de producción. En otras realizaciones, el pretratamiento puede llevarse a cabo después que se ha pretratado la lignocelulosa que no ha sido sometida a pretratamiento ácido. La biomasa lignocelulósica acondicionada y la composición que comprende la misma pueden almacenarse para uso en un tiempo posterior. De acuerdo con ello, la invención proporciona métodos, como se definen en las reivindicaciones, para preparación de un material de alimentación para cultivo de microorganismos, en donde se utiliza como componente de un material de alimentación una biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido acondicionada para crecimiento microbiano con una composición enzimática de la invención,.

En otra realización, la composición enzimática puede añadirse directamente durante el cultivo de los microorganismos de producción. La composición enzimática puede añadirse en un momento durante un proceso, por ejemplo, al comienzo del proceso, en una etapa en la que se liberan los compuestos inhibitorios, en una etapa en la que se añaden al cultivo los microorganismos de producción, o en una etapa en la que deben maximizarse el crecimiento de los microorganismos de producción. En otra realización adicional, la composición enzimática puede ser producida por una o más cepas del microorganismo de producción que producen la o las enzimas natural o recombinantemente y secretan la o las enzimas en el cultivo.

La composición enzimática comprende al menos una enzima oxidante de los fenoles. Como se describe en detalle en la Sección 6.2, la enzima oxidante de los fenoles puede ser una lacasa producida por un hongo, preferiblemente un hongo filamentoso, y muy preferiblemente un hongo ascomiceto. La enzima oxidante de los fenoles puede encontrarse en diversas formas, tales como, pero sin carácter limitante, en forma cristalizada, forma inmovilizada, filtrado de cultivo fúngico, y extractos de células fúngicas.

El uso de la composición enzimática mejora uno o más aspectos del proceso cuando se compara con el mismo proceso excepto el uso de una celulosa que no ha sido acondicionada. Por ejemplo, puede mejorarse la cinética del crecimiento microbiano en un biorreactor o la ganancia en biomasa microbiana durante un tiempo unidad en una etapa particular de un proceso. En diversas realizaciones, los procesos contemplados se utilizan para fabricar un producto, tal como combustible, productos químicos comerciales, productos de química fina, enzimas, compuestos farmacéuticos intermedios, etc. Por tanto, la invención abarca también métodos, como se definen en las reivindicaciones, para fabricar un producto deseado que implican cultivar microorganismos que producen el producto deseado en una biomasa lignocelulósica acondicionada que no se ha sometido a pretratamiento ácido, y recuperar el producto deseado del proceso. Una descripción detallada de los tipos de procesos a los que puede aplicarse la invención se proporciona en la Sección 6.3.

Para claridad de la exposición, y sin carácter de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que siguen.

6.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

En la presente invención puede utilizarse una diversidad de biomasa vegetal. La biomasa vegetal más abundante es la lignocelulosa que se encuentra en hojas y tallos de plantas leñosas y no leñosas. La lignocelulosa se compone de cadenas de celulosa heterogéneas entrelazadas con diversos grados de cristalinidad, hemicelulosas y pectinas, embebidas en lignina. Típicamente, el contenido de celulosa está comprendido en el intervalo de aproximadamente 35% a 50% del peso seco de la planta, y las hemicelulosas y ligninas comprenden respectivamente 20% a 35% y 5% a 30% del peso seco de la planta.

Como se utiliza en esta memoria, el término "lignocelulosa leñosa" se refiere a lignocelulosa presente en las plantas que comprenden madera que es el tejido de xilema secundario que forma la mayor parte del tallo y la raíz de una planta leñosa. El xilema secundario está formado por un cambium vascular y se encuentra en (i) coníferas (Coniferae) y (ii) angiospermas (Angiospermae) excepto en plantas monocotiledóneas. Muchas coníferas son árboles altos y el xilema secundario de tales árboles se conoce como madera blanda. Muchas angiospermas no monocotiledóneas son árboles, y el xilema secundario de éstas se conoce como madera dura. El xilema secundario se encuentra también en miembros de los grupos de gimnospermas Gnetofitas y Ginkgofitas y en menor proporción en miembros de las Cicadofitas.

La lignocelulosa de las plantas leñosas podría incluir podas de huerto, chaparral, desechos de molienda (tales como corteza, astillas, virutas, serrín y análogos), desechos de madera urbanos (tales como maderos desechados, bandejas de madera, cajones de embalaje, recortes de árboles y arbustos, etc.), desechos municipales (tales como papel de periódicos y productos comestibles desechados), desechos de troncos y aclaramientos de bosque (desmochados, ramas y material de entresacado de árboles), cosechas leñosas de rotación corta tales como chopo y álamo americano, y desechos industriales (tales como fangos de pasta papelera y desechos de lejía al sulfito de la pasta de papel).

El término "lignocelulosa no leñosa" hace referencia a biomasa de plantas derivada de plantas monocotiledóneas, y especialmente especies herbáceas pertenecientes a la familia Gramíneas. De interés fundamental son los residuos agrícolas de gramíneas; es decir, la porción de las plantas portadoras de grano que queda después de cosechar la semilla. Biomasa lignocelulósica no leñosa incluye, sin limitación, paja de trigo, paja de avena, paja de arroz, paja de cebada, paja de centeno, paja de lino, bagazo de caña de azúcar, forraje de maíz, tallos de maíz, carozos de maíz, vainas de maíz, y análogos. Se incluyen también dentro de esta definición hierbas no cultivadas convencionalmente para propósitos agrícolas, tales como hierbas de pradera (v.g. tallo azul grande, tallo azul pequeño, hierba índica), mijo perenne, hierba gama, y carricera.

Otros subproductos agrícolas que se consideran biomasa vegetal y que contienen lignocelulosa incluyen corrientes de desecho componentes del procesamiento comercial de materiales de cosecha (tales como pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos, cáscaras de semillas, y análogos), desechos celulósicos de animales, recortes de céspedes, y algas marinas.

Los materiales vegetales que contienen lignocelulosa pueden modificarse físicamente, por ejemplo, por desmenuzamiento, trituración, molienda, pulverización, o maceración. Los materiales vegetales que contienen lignocelulosa pueden estar también empapados en agua, empapados en agua caliente (es decir, por encima de la temperatura ambiente, v.g., a aproximadamente 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C, 99°C, y a presión normal o superior a la atmosférica, exponerse a vapor o agua sobrecalentada, o sometidos a explosión de vapor. En una realización, el material vegetal que contiene lignocelulosa no ha sido pretratado químicamente con álcali.

Los términos "pretratamiento" o "pretratamiento químico" se utilizan intercambiamente para hacer referencia a un paso de proceso que convierte la lignocelulosa de su forma nativa, en la que la misma es generalmente reacia a la acción de las celulasas, en una forma para la cual la hidrólisis enzimática es eficaz y/o eficiente. El término "hidrolizado" o variaciones del mismo se utiliza en esta memoria para hacer referencia a cualquiera de las lignocelulosas arriba mencionadas que se han pretratado a fin de solubilizar al menos una porción del xilano y la

celulosa en el material y liberar monómeros que son azúcares. Ejemplos no limitantes de pretratamiento incluyen explosión de vapor en presencia o ausencia de tratamiento con ácido sulfúrico diluido o cal apagada (es decir, óxido de calcio apagado con agua para formar hidróxido de calcio).

5 El término "lignocelulosa", como se utiliza en esta memoria hace referencia a cualquiera de los materiales vegetales que contienen lignocelulosa mencionados anteriormente que no ha sido pretratado químicamente. El término "biomasa lignocelulósica" se refiere a cualquiera de los materiales vegetales que contienen lignocelulosa mencionados anteriormente en su forma nativa, en una forma físicamente modificada (v.g., por desmenuzamiento o pulverización), en una forma tratada con agua o vapor, o en una forma después de pretratamiento químico que no es pretratamiento ácido, que podría hacerlo útil como material de alimentación para cultivo de microorganismos. La biomasa lignocelulósica leñosa y la biomasa lignocelulósica no leñosa se derivan de plantas leñosas y plantas no leñosas, respectivamente. Típicamente, biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido está presente en una composición, tal como un material de alimentación, como uno de varios componentes nutrientes.

15 Entre los subproductos agrícolas disponibles, el forraje de maíz es la lignocelulosa no leñosa más abundante en los Estados Unidos. El forraje de maíz comprende el tallo, carozo, hollejo, y las hojas que quedan después de la recolección del grano. La recogida del forraje puede realizarse fácilmente por desconexión del esparcidor y/o la cuchilla en la cosechadora del maíz y recogida de los residuos con equipo convencional de embalaje del heno. Aproximadamente 40% de la materia seca en el forraje de maíz es celulosa. El pretratamiento con vapor separa la mayor parte de la hemicelulosa del material sólido y hace la celulosa más sensible a la digestión enzimática. Pueden aplicarse combinaciones diferentes de temperatura de reacción, tiempo y pH durante el pretratamiento con vapor, v.g., 200°C, 5 minutos, y H₂SO₄ al 2%. El líquido que queda después de la explosión de vapor puede utilizarse para fermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. En una realización, el forraje de maíz se utiliza en una forma bruta seca. En otras realizaciones, puede utilizarse también forraje de maíz que ha sido lavado con agua.

30 Otra lignocelulosa no leñosa abundante está constituida por residuos de caña de azúcar, v.g., bagazo, que es el residuo fibroso que queda después que los tallos de caña de azúcar se trituran para extraer sus jugos. En Brasil, se produce etanol combustible a partir de caña de azúcar que es una fuente más eficiente de carbohidratos fermentables que el maíz. El bagazo ha sido utilizado como combustible para realizar el proceso de fermentación. Se considera que el bagazo de caña de azúcar puede utilizarse también como fuente de nutrientes para crecimiento de microorganismos después que el mismo ha sido acondicionado por los métodos de la invención. En una realización, el bagazo de caña de azúcar se encuentra en una forma bruta seca que no ha sido pretratada. En otras realizaciones, el bagazo de caña de azúcar se utiliza en una forma que ha sido lavada con agua.

35 Cualquiera de las biomasa lignocelulósicas arriba mencionadas que no ha sido sometida a pretratamiento ácido puede utilizarse directamente en un proceso microbiano, o utilizarse para fabricar una composición que comprende biomasa lignocelulósica, tal como un material de alimentación. En ciertas realizaciones, se prefiere una biomasa lignocelulósica que no ha sido pretratada químicamente, dado que el pretratamiento con álcali genera compuestos que inhiben los procesos microbianos.

6.2 COMPOSICIONES ENZIMÁTICAS

45 La presente invención proporciona el uso de una composición enzimática que comprende al menos una enzima oxidante de los fenoles para acondicionar una biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido o una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido. El término "enzima oxidante de los fenoles", como se utiliza en esta memoria, se refiere a enzimas que funcionan por catálisis de reacciones redox, es decir, la transferencia de electrones de un donante de electrones (usualmente un compuesto fenólico) a oxígeno molecular (que actúa como aceptor de electrones) que se reduce a agua. Ejemplos de tales enzimas son lacasas (EC 1.10.3.2), bilirrubin-oxidasas (EC 1.3.3.5), fenol-oxidasas (EC 1.14.18.1), catecol-oxidasas (EC 1.10.3.1). Las enzimas oxidantes de los fenoles de la presente invención son susceptibles de utilizar una gran diversidad de compuestos fenólicos diferentes como donantes de electrones, en tanto que son muy específicas para el oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno como el aceptor de electrones.

55 Muchas enzimas oxidantes de los fenoles exhiben valores óptimos de pH en el campo de pH ácido, en tanto que son inactivas a valores de pH neutros o alcalinos. Es preferible utilizar una enzima oxidante de los fenoles cuyo valor óptimo de pH caiga dentro del intervalo de pH de la biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido. Se sabe que enzimas A oxidantes de los fenoles son producidas por una gran diversidad de hongos, que incluyen especies de los géneros *Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospora*, *Botrytis*, *Pleurotus*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Fomes*, *Phlebia*, *Trametes*, *Polyporus*, *Rhizoctonia* y *Lentinus*.

65 En una realización, enzimas oxidantes de los fenoles producidas por especies de *Trichoderma* o *Hypocrea* pueden utilizarse en los métodos de la invención. Especies, cepas y aislados naturales de *Trichoderma*, y derivados de tales especies, cepas y aislados, incluyen cepas de las especies *Trichoderma piluliferum*, *Trichoderma reesei*, y *Trichoderma longibrachiatum*. *Trichoderma piluliferum* puede aislarse de muestras de tierra vegetal, y ha sido descrita por J. Webster y Rifai, M.A. 1969, Myco. Pap. 116:16; véase también la Patente U.S. Núm. 6.475.566

(conocida también como *Hypocrea pilulifera*). En una realización, enzimas oxidantes de los fenoles son producidas por cualquier hongo que se cultive sobre un sustrato de madera. En una realización, se utilizan cualesquiera hongos Ascomycetos que produzcan fenol-oxidasas.

5 La fuente de un gel de lacasa para la presente invención puede ser una lacasa de planta, microbio, insecto, o mamífero. En una realización, la o las lacasas es/son una lacasa fúngica. Por ejemplo, la o las lacasas pueden ser una lacasa fúngica filamentosa tal como una lacasa de una especie de *Acremonium*, *Agaricus*, *Amerosporium*, *Antrodia*, *Armillaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Bjerkandera*, *Cerrena*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Cochliobolus*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Cryphonectria*, *Curvularia*, *Cyathus*, *Daedalea*,
 10 *Filibasidium*, *Fomes*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Giocladium*, *Gongronella*, *Halosarphei*, *Humicola*, *Hypocrea*, *Lactarius*, *Lentinus*, *Magnaporthe*, *Monilia*, *Monocillium*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Panus*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phellinus*, *Phlebia*, *Pholiota*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Podospora*, *Pycnoporus*, *Pyricularia*, *Rigidoporus*, *Rhizoctonia*, *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Scytalidium*, *Sordaria*, *Sporotrichum*, *Stagonospora*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyocladium*, *Trametes* (*Polyporus*),
 15 *Veretillum*, *Zalerion*, *Zyphia*, *Trichoderma*, o una lacasa de levadura de especies de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*. Más específicamente, la lacasa puede ser una lacasa de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Trametes villosa* (*Polyporus pinsitus*), *Rhizoctonia solani*, o *Scytalidium thermophilum*.

20 En otra realización, la o las lacasas es una lacasa de origen vegetal. Por ejemplo, la o las lacasas puede ser una lacasa de laca, mango, haba mung, melocotón, pino, ciruela, o sicomoro. En otra realización adicional, la o las lacasas es una lacasa de insecto. Por ejemplo, la o las lacasas pueden ser una lacasa de *Bombyx*, *Calliphora*, *Diptoptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phorma*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca*, o *Tenebrio*.

25 En otra realización adicional, la o las lacasas es preferiblemente una lacasa bacteriana. Por ejemplo, la o las lacasas pueden ser una lacasa de *Acer*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Halobacterium*, *Mycobacterium*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Wolinella*, o una bacteria metilotrófica.
 30 Más específicamente, la lacasa es una lacasa de *Azospirillum lipoferum*.

En otra realización, pueden utilizarse en los métodos de la invención enzimas oxidantes de los fenoles producidas por especies de *Stachybotrys*. Las especies, cepas y aislados naturales de *Stachybotrys*, y derivados de tales especies, cepas y aislados, incluyen cepas de la especie *Stachybotrys parvispora* que incluyen, en particular,
 35 *Stachybotrys parvispora* var. *hughes* MUCL 38996; cepas de la especie *Stachybotrys chartarum* que incluyen, en particular, *Stachybotrys chartarum* MUCL 38898; *S. parvispora* MUCL 9485; *S. chartarum* MUCL 30782; *S. kampalensis* MUCL 39090; *S. theobromae* MUCL 39293, y cepas de las especies *S. bisbyi*, *S. cylindrospora*, *S. dichroa*, *S. oenanthes* y *S. nilagerica*.

40 Las lacasas (bencenodiol:oxígeno oxidorreductasas; E.C. 1.10.3.2) son enzimas que contienen cobre que catalizan la oxidación de los compuestos fenólicos. Las oxidaciones mediadas por lacasas producen compuestos intermedios de radicales ariloxi a partir de un sustrato fenólico que da como resultado la formación de productos de reacción dímeros a polímeros. En una realización, la composición enzimática de la invención comprende una lacasa de una especie *Stachybotrys* como se describe en la patente U.S. 3.426.410 (véanse también las patentes U.S. Núms.
 45 6.168.936 y 6.905.853). En otra realización, la composición enzimática de la invención comprende una lacasa de *Trichoderma piluliferum*.

La actividad de las lacasas puede determinarse por cualesquiera medios conocidos en la técnica, tales como oxidación de la siringaldazina monitorizada a 530 nm, oxidación de 10-(2-hidroxi-etil)-fenoxazina (HEPO) que puede monitorizarse fotométricamente a 598 nm, u oxidación del ácido 2,2',-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) (ABTS). Por ejemplo, se mezclan 60 µl de solución stock de siringaldazina (0,28 mM en etanol al 50%) y 20 µl de una muestra de lacasa con 0,8 ml de solución tampón Britton-Robinson precalentada, y se incuban a 20°C. La oxidación se monitoriza a 530 nm durante 5 minutos y la actividad se expresa como µmoles ("SOU") de siringaldazina oxidados por minuto ("SU"). Véase, Childs et al. (1975, *Biochemical Journal* 145:93-103) y Bauer et al. (1971, *Analytical Chemistry* 43: 421-425).
 50
 55

En una realización, la o las enzimas oxidantes de los fenoles de la invención pueden producirse fácilmente por métodos de síntesis bien conocidos en la técnica si se conoce la secuencia de aminoácidos de la enzima.

60 En otra realización, las enzimas oxidantes de los fenoles de la presente invención pueden producirse por cultivo de organismos productores de enzimas oxidantes de los fenoles, que incluyen hongos, bacterias, y plantas. Preferiblemente, durante el cultivo, el organismo productor de la enzima oxidante de los fenoles secreta extracelularmente las enzimas oxidantes de los fenoles. Esto permite la recuperación, aislamiento y purificación de la enzima oxidante de los fenoles mediante, por ejemplo, separación de la masa celular de un caldo de cultivo (v.g.
 65

por filtración o centrifugación). El caldo de cultivo exento de células resultante puede utilizarse como tal o, si se desea, puede concentrarse primeramente (v.g. por evaporación o ultrafiltración). Si se desea, la enzima oxidante de los fenoles puede separarse luego del caldo exento de células y aislarse al grado deseado de pureza por métodos convencionales, v.g. por cromatografía en columna, o incluso cristalizarse.

5 En una realización específica, el organismo productor de la enzima oxidante de los fenoles es un organismo recombinante que comprende materiales genéticos heterólogos que facilitan la expresión de un gen que codifica la enzima oxidante de los fenoles y/o la producción de la enzima oxidante de los fenoles. El material genético heterólogo comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que exhibe actividades oxidantes de los fenoles. El término "heterólogo", cuando se utiliza por referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran normalmente en la misma relación recíproca en la naturaleza.

15 "Funcionalmente equivalente", como se utiliza el término en esta memoria, se refiere a un polipéptido capaz de exhibir una actividad oxidante de los fenoles sustancialmente similar o al menos una característica química como la lacasa de *Trichoderma piluliferum* como se ilustra en la sección 7 o la lacasa de especies de *Stachybotrys* como se describe en la Patente U.S. 6.426.410 (véanse también las Patentes U.S. Núms. 6.168.936 y 6.905.853). Como se utiliza en esta memoria, el término "característica química" se refiere al sustrato o funcionalidad química sobre la cual actúa la enzima y/o la reacción catalítica es realizada por la enzima.

20 Además del DNA de la lacasa ilustrada y las proteínas expuestas en esta memoria, la presente invención contempla la utilización de enzimas oxidantes de los fenoles homólogas o sustancialmente idénticas. El término "idéntico" en el contexto de dos secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos se refiere a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para correspondencia máxima, tal como se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguientes. La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse, v.g., por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de homología de alineación de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de semejanzas de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección visual. Otra indicación de que dos enzimas oxidantes de los fenoles son sustancialmente similares es que la primera enzima reacciona de modo inmunológicamente cruzado con la segunda enzima. Típicamente, enzimas que difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos son inmunológicamente reactivas de modo cruzado. Así, una enzima oxidante de los fenoles es sustancialmente similar a una segunda enzima oxidante de los fenoles, por ejemplo, donde las dos enzimas difieren únicamente por una sustitución conservadora.

40 Adicionalmente, los métodos de la invención abarcan también proteínas y polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a las enzimas oxidantes de los fenoles existentes naturalmente. Tales enzimas oxidantes de los fenoles equivalentes pueden contener, v.g., deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de las enzimas oxidantes de los fenoles conocidas. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse sobre la base de semejanza en polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo los residuos de aminoácidos no polares (es decir, hidrófobos) pueden incluir alanina (Ala o A), leucina (Leu o L), isoleucina (Ile o I), valina (Val o V), prolina (Pro o P), fenilalanina (Phe o F), triptófano (Trp o W) y metionina (met o M); residuos de aminoácidos polares neutros pueden incluir glicina (Gly o G); serina (Ser o S), treonina (Thr o T), cisteína (Cys o C), tirosina (Tyr o Y), asparagina (Asn o N) y glutamina (Gln o Q); residuos de aminoácidos cargados positivamente (es decir, básicos) pueden incluir arginina (Arg o R), lisina (Lys o K), e histidina (His o H); y residuos de aminoácidos cargados negativamente (es decir, ácidos) pueden incluir ácido aspártico (Asp o D) y ácido glutámico (Glu o E).

50 Será evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden hacerse fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y dar todavía como resultado un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico aislada de la invención, y por tanto no sujeta preferiblemente a sustitución, pueden identificarse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis orientada o mutagénesis de barrido de alanina (véase, v.g. Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085).

60 Polipéptidos funcionalmente equivalentes correspondientes a uno o más dominios de los productos de genes enzimáticos (v.g., secuencias señal, sitios activos, o dominios de fijación de sustrato), enzimas truncadas o delecionadas (v.g., polipéptidos en los cuales uno o más dominios de una enzima han sido delecionados) y enzimas de fusión (v.g., proteínas en las cuales una enzima de longitud total o truncada o delecionada, o un péptido o polipéptido correspondiente a uno o más dominios de la enzima está fusionado a una proteína no afín) están también dentro del alcance de la presente invención. Tales péptidos y polipéptidos funcionalmente equivalentes (a los que se hace referencia también como proteína o polipéptidos quiméricos) pueden ser diseñados fácilmente por los expertos en la técnica sobre la base del nucleótido del gen enzimático y las secuencias de aminoácidos. Proteínas de fusión ilustrativas pueden incluir, pero sin carácter limitante, proteínas de fusión con etiqueta de epítipo que facilitan el aislamiento del producto del gen enzimático por cromatografía de afinidad utilizando reactivos que se

- fijan al epítipo. Otras proteínas de fusión ilustrativas incluyen fusiones a cualquier secuencia de aminoácidos que permita, v.g., que la proteína de fusión se inmovilice sobre una fase sólida, permitiendo con ello que la enzima quede retenida y se reutilice después de una reacción. De acuerdo con ello, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende un fragmento de una enzima oxidante de los fenoles fusionada a un segundo polipéptido.
- 5 Otras modificaciones de la enzima oxidante de los fenoles arriba descrita pueden hacerse para generar polipéptidos funcionalmente equivalentes que son más adecuados, v.g., para aumento de escala, para el pH ambiental de una biomasa lignocelulósica particular, etc. De acuerdo con ello, la presente invención abarca el uso de polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a enzimas oxidante de los fenoles.
- 10 La invención abarca composiciones enzimáticas que comprenden una cantidad catalíticamente eficaz de al menos una enzima oxidante de los fenoles, aislada, purificada o enriquecida en diversos grados, v.g., una de las enzimas oxidantes de los fenoles puede constituir aproximadamente 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% de la proteína total en la composición. Procedimientos para determinar la actividad de las lacasas, por ejemplo, se conocen la técnica e incluyen, v.g., la oxidación del sustrato ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico ("ABTS")) (véase, Childs et al., 1975, *Biochemical Journal* 145: 93-103) o siringaldazina (véase, Bauer et al., 1971, *Analytical Chemistry* 43: 421-425), o el uso de 2,6-dimetoxifenol (véase, Haars et al., 1981, *European Journal of Forest Pathology*, 11 (1-2), 67-76.) o guayacol (véase Setti et al., 1999, *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5), 285-289.)
- 15 La o las enzimas contenidas en la composición se encuentran en una forma adecuada para uso con la biomasa lignocelulósica propuesta, y pueden contener enzimas adicionales, agentes estabilizadores, conservantes, inhibidores de proteasas, detergentes, agentes antiespumantes, etc. A menudo estos procesos son eficaces en costes únicamente cuando las enzimas pueden reutilizarse muchas veces. Para reutilización de las enzimas, las enzimas tienen que separarse de la masa del proceso. Esto puede realizarse cuando las enzimas están unidas a un portador o fase sólida que puede aislarse, por ejemplo, por escurrido, filtración o centrifugación. Esto puede realizarse también si el sustrato se hace fluir a través de la superficie de la fase sólida en la que se realizan los contactos con las enzimas. De acuerdo con ello, la presente invención abarca el uso de enzimas oxidantes de los fenoles que existen no sólo en la forma soluble que fluye libremente, sino también en formas inmovilizadas o sólidas.
- 20 En otra realización, las enzimas oxidantes de los fenoles de la invención están inmovilizadas en forma de proteínas purificadas en grados variables como se ha descrito arriba. Puede utilizarse cualquier método conocido para inmovilización de enzimas basado en la fijación química y física de la enzima a una fase sólida, v.g. polisacáridos, vidrio, polímeros sintéticos, partículas magnéticas, que están usualmente modificadas con grupos funcionales, tales como amina, carboxi, epoxi, fenilo o alcano para hacer posible el acoplamiento covalente a cadenas laterales de aminoácidos en la superficie de la enzima. La fase sólida puede ser porosa, con diámetros de poro comprendidos en el intervalo de 30 a 300 nm. La adsorción iónica y no iónica a un soporte poroso puede ser un método simple y eficaz de inmovilización. Las enzimas pueden estar también atrapadas o encapsuladas en geles polímeros, membranas, o micelas en gotitas acuosas estabilizadas con surfactantes. La elección de un método de inmovilización adecuado para una enzima dada depende de las características enzimáticas, demandas de proceso, propiedades del soporte, y cuestiones de seguridad, y puede ser determinada por un experto en la técnica. Métodos para inmovilización de enzimas se pueden encontrar, por ejemplo, en *Methods of Enzymology*, vol. 44, 135, 136, y 137, Academic Press, Nueva York. Conforme a ello, la invención abarca la utilización de una composición enzimática que comprende una o más fases sólidas, en donde están presentes en la o las fases sólidas una o más enzimas oxidantes de los fenoles catalíticamente activas.
- 30 La invención abarca adicionalmente la utilización de enzimas oxidantes de los fenoles en forma sólida. Métodos de fabricación de formas sólidas de enzimas son bien conocidos en la técnica, tales como, pero sin carácter limitante, esferonización (enfriamiento por pulverización en un material céreo), extrusión, aglomeración, o granulación (dilución con un material inerte y ligantes). Se contemplan composiciones enzimáticas sólidas que comprenden una forma sólida de una o más enzimas oxidantes de los fenoles, en la forma de polvo mixto, tabletas, y análogos.
- 45
- 50

6.3 MICROORGANISMOS DE PRODUCCIÓN

- De acuerdo con la invención, una biomasa lignocelulósica que no se ha sometido a pretratamiento ácido o una composición que contiene biomasa lignocelulósica que no se ha sometido a pretratamiento ácido acondicionada por enzimas oxidantes de los fenoles puede utilizarse como fuente de nutrientes para una diversidad de procesos biotecnológicos. El acondicionamiento de la biomasa lignocelulósica mejora la tasa de crecimiento de microorganismos de producción, acelerando la conversión de la biomasa vegetal en biomasa microbiana. Además de la acumulación de biomasa microbiana, en otras realizaciones, el objetivo de cultivo de los microorganismos en la biomasa lignocelulósica es obtener uno o más productos producidos por microorganismos. Como resultado de la utilización de la composición enzimática de la invención, en ciertas realizaciones, no sólo se mejora la cinética del proceso, sino que se aumenta también el rendimiento del o los productos deseados. El término "microorganismo de producción" como se utiliza en esta memoria hace referencia a una especie de un microorganismo que produce un producto deseado en un proceso microbiano, o que es en sí mismo el producto deseado de un proceso microbiano.
- 55 El término abarca también cualquier progenie de los microorganismos que crezca en el proceso.
- 60
- 65

Muchos procesos microbianos que utilizan biomasa lignocelulósica como fuente de nutrientes pueden verse beneficiados por los métodos de la invención que incluyen, pero sin carácter limitante, procesos microbianos para fabricar enzimas industrialmente útiles, tales como pero sin carácter limitante, una hidrolasa, una oxidorreductasa, una isomerasa, una ligasa, una liasa, o una transferasa. Más preferiblemente, la enzima pertenece a la clase de las celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas), tanasas, oxidasas, v.g., glucosa-oxidasas, glucoamilasas, fitasas, β -galactosidasas, sacarosas o invertasas, lipasas, proteasas, amilasas, lacasas, poligalacturonasas, carboxipeptidasas, catalasas, quitinasas, cutinasas, ciclodextrin-glicosil-transferasas, desoxirribonucleasas, esterasas, haloperoxidasas, lacasas, manosidasas, enzimas pectinolíticas, peroxidasas, xilosa-isomerasas y xilanasas. Otros productos útiles que son producidos por cultivos microbianos incluyen ácidos orgánicos tales como, pero sin carácter limitante, ácido cítrico, ácido itacónico, ácido glucónico, ácido fumárico, ácido málico, ácido láctico, y ácido tartárico; aminoácidos, tales como pero sin carácter limitante, triptófano, lisina, metionina, ácido glutámico, treonina, alanina, fenilalanina, y ácido aspártico; polisacáridos tales como, pero sin carácter limitante, pululano; lípidos, nucleótidos, y vitaminas. Otros productos útiles que son producidos por cultivos microbianos incluyen alcoholes, tales como pero sin carácter limitante, etanol. Otros productos útiles que son producidos por cultivos microbianos incluyen glucosa que puede ser utilizada subsiguientemente por otro microorganismo para producir etanol, o utilizarse como sustancia de fermentación para fabricar cualquier clase de producto de base microbiana.

Microorganismos de producción incluyen, pero sin carácter limitante, bacterias y hongos, con inclusión de levaduras. Muchos Ascomicetos, Basidiomicetos, y Deuteromicetos son conocidos por sus enzimas celulolíticas y/o su capacidad de degradación de la madera, y pueden utilizar biomasa lignocelulosa como fuente de nutrientes. Tales hongos incluyen, pero sin carácter limitante, especies de los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium* y *Helotium* (Ascomicetos); *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* y *Serpula* (Basidiomicetos); y *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Deuteromicetos). Especies ilustrativas que pueden utilizar biomasa lignocelulósica como nutriente incluyen, pero sin carácter limitante, especies de *Trichoderma* o *Hypocrea*. En una realización, la especie de *Trichoderma* es *Trichoderma reesei*.

Varios grupos diversos de bacterias pueden crecer sobre una biomasa lignocelulósica: (i) anaerobias de fermentación, típicamente Gram-positivas (*Clostridium*, *Ruminococcus*, y *Caldicellulosiruptor*) pero que contienen unas pocas especies Gram-negativas (*Butyrivibrio* y *Acetivibrio*, *Fibrobacter*); (ii) bacterias gram-positivas aerobias (*Cellulomonas* y *Thermobifida*); y (iii) bacterias aerobias deslizantes (*Cytophaga* y *Sporocytophaga*). Bacterias ilustrativas que pueden utilizar lignocelulosa como nutriente incluyen, pero sin carácter limitante, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium cellulovorans* y *Clostridium josui*.

El desarrollo de microorganismos para conversión de la celulosa prosigue conforme a dos estrategias. La estrategia celulolítica natural implica microorganismos celulolíticos existentes naturalmente para mejorar las propiedades relacionadas con el producto tales como rendimiento y tolerancia. Tales microorganismos pueden ser microorganismos de producción de la invención e incluyen, pero sin carácter limitante, *Clostridium thermocellum*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma viride*, especies de *Zygosaccharomyces*, especies de *Aspergillus* y especies de *Paecilomyces*. El enfoque celulolítico recombinante implica la transformación por ingeniería genética de microorganismos no celulolíticos que exhiben altos rendimientos de producto y tolerancia de tal modo que se vuelven capaces de utilizar celulosa como resultado de un sistema de celulasas heterólogo. Tales microorganismos pueden ser también microorganismos de producción de la invención e incluyen, pero sin carácter limitante, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, y *Zymomonas mobilis*. De acuerdo con ello, los métodos de la invención pueden utilizarse para mejorar la cinética de crecimiento y/o el rendimiento de cultivo de microorganismos que expresan naturalmente celulasas o que están transformados genéticamente para expresar una o más celulasas heterólogas, y que permiten su utilización de la celulosa como fuente de nutrientes.

6.4 MÉTODOS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método, como se define en las reivindicaciones, para tratamiento de una biomasa lignocelulósica que no se ha sometido a pretratamiento ácido o una composición que comprende biomasa lignocelulósica (tal como un material de alimentación que comprende otros nutrientes) que no ha sido sometida a pretratamiento ácido con una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles, de tal modo que la tasa de crecimiento de un microorganismo de producción sobre dicha biomasa lignocelulósica o dicha composición se incrementa con relación a una biomasa lignocelulósica o composición que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido tratada con la composición enzimática. El aumento en la tasa de crecimiento de un microorganismo de producción en un proceso puede estimarse por varios parámetros, tales como, pero sin carácter limitante, consumo de nutrientes, acumulación de catabolitos, pH, masa de células, número de células, etc. En diversas realizaciones de la invención, el tratamiento con la composición enzimática aumenta la tasa de crecimiento inicial de los microorganismos en un cultivo en el que se utiliza una composición que comprende biomasa lignocelulósica como fuente de nutrientes.

En una realización, la invención proporciona un método, como se define en las reivindicaciones, para acondicionamiento de una biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido o una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido. El método

implica poner en contacto una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles con la biomasa lignocelulósica o la composición que comprende biomasa lignocelulósica. El término "puesta en contacto" se utiliza en esta memoria intercambiamente con los siguientes: introducción en, combinación con, adición a, 5 mezcladura con, paso sobre, incubación con, inyección en, flujo sobre, etc. Se contempla que pueden utilizarse formas diferentes de la enzima oxidante de los fenoles como se describe arriba. El proceso de acondicionamiento o tratamiento puede transcurrir durante un periodo de tiempo, que oscila desde 1 hora, 2, 5, 10, 15, 24, 36, 48, 60, 72 horas, hasta 4, 5, 6 ó 7 días, o hasta que la actividad inhibidora de la biomasa lignocelulósica se reduce a un nivel aceptable, v.g., menos de 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% del nivel original. El 10 periodo de tiempo para el contacto puede determinarse también por medida del aumento en la tasa de crecimiento de un microorganismo que está soportado por la composición acondicionada, v.g., al menos 110%, 120%, 125%, 130%, 140%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500% o 1000% de la tasa original.

Preferiblemente, el paso de puesta en contacto se lleva a cabo a una temperatura comprendida dentro de un intervalo en el que la enzima exhibe actividad sustancial u óptima. Preferiblemente, el paso de puesta en contacto se 15 realiza en un intervalo de pH en el que la enzima exhibe actividad sustancial u óptima. De acuerdo con ello, la invención abarca una composición que comprende una biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido, que ha sido tratada o acondicionada para soportar el crecimiento microbiano con una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles. Una composición de este tipo puede utilizarse como material de alimentación o utilizarse como un componente para fabricar un material de alimentación. 20 La biomasa lignocelulósica acondicionada puede utilizarse como material de alimentación para una diversidad de procesos microbianos. En ciertas realizaciones, la biomasa lignocelulósica es la única fuente de nutrientes o única fuente de carbono en la composición. En una realización, la invención proporciona un método para fabricar un material de alimentación que comprende poner en contacto una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles con la biomasa lignocelulósica o la composición que comprende biomasa lignocelulósica, y 25 añadir otros nutrientes y/o componentes de materiales de alimentación a la biomasa lignocelulósica acondicionada. En algunas realizaciones, la composición enzimática se separa de la composición que comprende la biomasa lignocelulósica antes del uso de la composición en un proceso microbiano. En diversas realizaciones, puede utilizarse una gama de concentraciones de enzima para acondicionar el material de alimentación, v.g., desde aproximadamente 0,0001 g/l a aproximadamente 100 g/l, tal como, pero sin carácter limitante, 0,001 g/l, 0,1 g/l, 1 g/l, 30 10 g/l. En diversas realizaciones, puede utilizarse un intervalo de duración del tratamiento o acondicionamiento, v.g., aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 200 horas, tal como, pero sin carácter limitante, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 24 horas, 36 horas, 72 horas o 96 horas. En diversas realizaciones, el tratamiento o acondicionamiento puede llevarse a cabo en un intervalo de temperaturas, v.g., a aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 100°C, tal como, pero sin carácter limitante, 35 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, o la temperatura ambiente en el lugar de tratamiento o acondicionamiento. En diversas realizaciones, el tratamiento o acondicionamiento puede llevarse a cabo en un intervalo de valores de pH, v.g., aproximadamente desde pH 2 a aproximadamente pH 10, tal como pero sin carácter limitante, aproximadamente pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, o pH 9. En una realización, los métodos se llevan a cabo en el intervalo de pH 4,5 a 6,5. En otra realización, el pH es aproximadamente 4,5 a 5,5.

La invención proporciona adicionalmente métodos, como se definen en las reivindicaciones, para cultivar 40 microorganismos de producción en un medio de cultivo que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido, en donde los métodos comprenden poner en contacto el medio de cultivo con una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles. En otra realización, la invención proporciona el uso de una biomasa lignocelulósica acondicionada que no ha sido sometida a pretratamiento ácido para cultivar microorganismos. La invención proporciona adicionalmente métodos, como se definen en las reivindicaciones, para fabricación de un producto en el que el producto está constituido por un microorganismo de 45 producción que está cultivado en un medio de cultivo que comprende una biomasa lignocelulósica acondicionada que no ha sido sometida a pretratamiento ácido. Tales métodos comprenden cultivar los microorganismos de producción A en un medio de cultivo tratado con una composición enzimática que comprende una enzima oxidante de los fenoles y recuperar el producto del cultivo y/o los microorganismos. 50

Se contempla que los procesos microbianos para producción de un producto deseado incluyen cultivo sólido o sumergido, con inclusión de procesos de lotes, de lote alimentado y de flujo continuo. El cultivo se realiza en un 55 medio que comprende un medio de sales minerales acuosas, factores de crecimiento orgánicos, materiales fuente de carbono, materiales fuente de energía, o una combinación de los mismos, y el empleo de un inóculo de partida de una o más especies de microorganismos de producción.

Se contempla que la invención puede aplicarse a muchos tipos diferentes de procesos así como etapas diferentes 60 de un proceso complejo. Un ejemplo de un proceso complejo es la conversión de lignocelulosa en azúcares y luego en etanol, que puede implicar diferentes microorganismos en las distintas etapas del proceso.

En el contexto de la conversión de lignocelulosa en combustibles y productos químicos, están implicados los 65 procesos siguientes: (i) producción de celulasa, (ii) hidrólisis de la celulosa y, si están presentes, otros polisacáridos insolubles (sacarificación), (iii) fermentación de los productos solubles de hidrólisis de la celulosa, y (iv) fermentación de los productos solubles de hidrólisis de la hemicelulosa. En la extensión en que estos procesos se llevan a cabo

por cultivo de microorganismos en presencia de biomasa lignocelulósica que no se ha sometido a pretratamiento ácido, la composición enzimática o biomasa lignocelulósica acondicionada de la invención puede utilizarse en uno o más de estos pasos individuales para mejorar la cinética de crecimiento de los microorganismos y/o el rendimiento de cada paso.

5 Estos cuatro pasos pueden llevarse a cabo por separado o consolidados en diversas configuraciones. La sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) consolida la hidrólisis y fermentación de los productos de hidrólisis de la celulosa en un solo paso de proceso, teniendo lugar la producción de la celulasa y la fermentación de los productos de hidrólisis de la hemicelulosa en dos pasos de proceso discretos adicionales. La sacarificación y
10 cofermentación simultánea (SSCF) implica dos pasos de proceso: producción de celulasa y un segundo paso en el que tienen lugar la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los productos de hidrólisis tanto de la celulosa como de la hemicelulosa. En el bioprocesamiento consolidado (CBP), se combinan la producción de celulasa, la hidrólisis, y la fermentación de los productos de celulosa y hemicelulosa. Conforme a la invención, la composición enzimática puede utilizarse también en uno o más pasos en estos procesos consolidados para mejorar la cinética de crecimiento de los microorganismos y/o el rendimiento de cada paso. Alternativamente, la biomasa lignocelulósica
15 acondicionada que no se ha sometido a pretratamiento ácido (tratada previamente con la composición enzimática de la invención) puede utilizarse en uno o más pasos en estos procesos consolidados.

20 De acuerdo con ello, en una realización de la invención, puede utilizarse una composición enzimática que comprende una o más enzimas oxidantes de los fenoles en un proceso de producción de celulasas. La composición enzimática puede añadirse al cultivo de microorganismos de producción que produce la celulasa que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido como fuente de nutrientes. El método puede abarcar también la recuperación de las celulasas del cultivo.

25 En otra realización, una composición enzimática que comprende una o más enzimas oxidantes de los fenoles puede utilizarse en un proceso de crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido, en donde el microorganismo hidroliza la celulosa y otros polisacáridos insolubles para formar disacáridos y monosacáridos. El proceso puede incluir opcionalmente la recuperación de los disacáridos y monosacáridos.
30

En otra realización adicional, puede utilizarse una composición enzimática que comprende una o más enzimas oxidantes de los fenoles en un proceso de crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo que comprende biomasa lignocelulósica, en donde los microorganismos son capaces de convertir azúcares (tales como disacáridos y monosacáridos) en etanol u otros productos químicos de peso molecular bajo, tales como ácido acético o ácido láctico. En otra realización adicional, puede utilizarse una composición enzimática que comprende una o más
35 enzimas oxidantes de los fenoles en un proceso de crecimiento de microorganismos que son capaces de convertir hemicelulosa en etanol u otros productos químicos de peso molecular bajo, tales como ácido acético o ácido láctico.

40 En cada una de las realizaciones anteriores, en lugar de utilizar la composición enzimática directamente en el proceso, puede utilizarse la misma para tratar una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a tratamiento ácido, la cual se utiliza luego para cultivar los microorganismos de producción.

45 En diversas realizaciones, la biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido utilizada en cualquiera de los procesos arriba mencionados es lignocelulosa derivada de una planta leñosa, lignocelulosa derivada de una planta no leñosa, un hidrolizado de lignocelulosa, o una mezcla de una lignocelulosa y su hidrolizado.

50 En ciertas realizaciones de la invención, la biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido utilizada en un proceso de fermentación para producir etanol no es biomasa lignocelulósica leñosa, tal como hidrolizados de madera. En otras realizaciones de la invención, la biomasa lignocelulósica que no se ha sometido a pretratamiento ácido utilizada en el proceso no es un hidrolizado de hemicelulosa. En ciertas realizaciones, los microorganismos de producción que pueden crecer sobre biomasa lignocelulósica leñosa que no ha sido sometida a pretratamiento ácido y producir etanol no son cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. En ciertas realizaciones, la composición enzimática utilizada en el proceso no comprende una lacasa derivada de un basidiomiceto, tal como
55 una lacasa de *Trametes versicolor*.

60 En una realización de la invención, la composición enzimática se utiliza en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación. En otra realización adicional, la composición enzimática se utiliza en un proceso simultáneo de sacarificación y cofermentación. En otra realización adicional, la composición enzimática se utiliza en un bioproceso consolidado. En una realización, la concentración de enzima utilizada para tratamiento de la biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido oscila desde aproximadamente 0,001 g/l a 100 g/l. En una realización afín, la concentración de la enzima utilizada para tratamiento de la biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido no es inferior a aproximadamente 60 g/l, aproximadamente 30 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 0,6 g/l, aproximadamente 0,3 g/l, aproximadamente 0,01 g/l,
65 aproximadamente 0,006 g/l, o aproximadamente 0,003 g/l.

7. EJEMPLOS

La presente invención puede comprenderse mejor por referencia al ejemplo no limitante siguiente, que se proporciona únicamente como ilustrativo de la invención.

El experimento se condujo con la lacasa *Trichoderma piluliferum*, forraje bruto de maíz como la biomasa lignocelulósica, y *Trichoderma reesei* como el microorganismo de producción.

7.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de Enzima por *Trichoderma reesei*

Se preparó como sigue un inóculo de *Trichoderma reesei* RL-P37 (véase Sheir-Neiss et al. en Appl. Microbiol. Biotechnology, 20 (1984) pp. 46-53): un matraz de sacudidas que contenía (NH₄)₂SO₄ (4g), KH₂PO₄ (4,5g), MgSO₄·7H₂O (1g), CaCl₂·2H₂O (1g), NaCl (0,01g), Mazu DF 204, 5 gotas/L (0,2ml), pH 5,5, cant. suf. para 897,5 ml. Después de esterilización, se añadieron 100 ml de glucosa al 50% y 2,5 ml de solución de elementos traza de *T. reesei*. La solución de elementos traza de *T. reesei* contenía por litro: ácido cítrico (anhidro) 175g, FeSO₄·7H₂O (200g), ZnSO₄·7H₂O (16g), CuSO₄·5H₂O (3,2g), MnSO₄·H₂O (1,4g), H₃BO₃ (ácido bórico) (0,8g). La única fuente de carbono era glucosa a una concentración de 10 g/l. El cultivo se inoculó con aproximadamente un millón de esporas de RLP-37 por 50 ml en un matraz de 250 ml. El matraz se incubó a 26-28°C, 150 rpm, durante 3-5 días hasta que se obtuvo un crecimiento satisfactorio. El crecimiento de cultivo puede seguirse por medida del pH y la concentración de glucosa a lo largo del tiempo por técnicas estándar. Antes del agotamiento de la glucosa, pueden tomarse células fúngicas para inocular matraces para el experimento.

En este experimento, se utilizaron dos series de matraces, conteniendo cada matraz el mismo medio que anteriormente y 2% de forraje bruto de maíz. Los materiales de maíz que contenían lignocelulosa se habían desmenuzado, lavado con agua para eliminar la tierra vegetal y otros residuos agrícolas, después de lo cual se secaron al aire. El aspecto era el de recortes de hierba secos. Se añadió el mismo a los matraces de cultivo en esta forma seca y los matraces se trataron en autoclave para esterilizar su contenido antes de introducir el cultivo. Se añadió a una serie de matraces una parte alícuota de un filtrado que contenía lacasa de un cultivo de *Trichoderma piluliferum*. Se utilizaron tres concentraciones diferentes de lacasa, a saber 0,125 U/ml, 0,25 U/ml y 0,5 U/ml.

La presencia de actividad de enzima oxidante de los fenoles en el sobrenadante se midió utilizando el procedimiento de ensayo siguiente, basado en la oxidación de ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) por oxígeno. Se mezclaron en una cubeta ABTS (SIGMA, 0,2 ml, 4,5 mM H₂O) y NaOAc (1,5 ml, 120 mM en H₂O, pH 5,0). La reacción se inició por adición de una cantidad apropiada de la preparación a medir (que en este ejemplo es la dilución de sobrenadante) para formar una solución final de 1,8 ml. El color producido por la oxidación de ABTS se midió luego cada 2 segundos durante un periodo total de 14 segundos por registro de la densidad óptica (DO) a 420 nm, utilizando un espectrofotómetro. En este ejemplo, una unidad de ABTS (una unidad enzimática o EACU) se define como el cambio en DO medido a 420 por minuto (sin realizar dilución alguna de la muestra).

El conjunto de matraces de control no contenía cantidad alguna de lacasa. Los matraces se incubaron durante uno, dos o tres días a 30°C antes de ser inoculados con aproximadamente un millón de células RLP-37 que se habían dejado crecer durante 24 horas como se ha descrito arriba. Las dos series de matraces que contenían las células RLP-37 se dejaron crecer con agitación mediante sacudidas a 100-250 rpm a 20-28°C durante hasta 72 horas. El crecimiento de *T. reesei* en las dos series de cultivo se monitorizó por medida de la concentración de glucosa en el medio de cultivo, que disminuye gradualmente a medida que los hongos en cultivo consumen glucosa.

7.2. RESULTADOS

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 1. La disminución de la concentración de glucosa indica un crecimiento satisfactorio de las células fúngicas. Las tasas de crecimiento óptimas se obtuvieron en matraces que contenían un medio de cultivo que comprendía una biomasa lignocelulósica (forraje de maíz al 2%) que se había acondicionado con 0,5 U/ml de lacasa durante al menos 2 días. En dos matraces (2 y 3 días de acondicionamiento con 0,5 U/ml) la totalidad de la glucosa contenida en los matraces se había agotado llegado el tercer día de cultivo con *T. reesei*. Dosis menores de lacasa o periodos de acondicionamiento más cortos producían cultivos con crecimiento más lento. Menos del 50% de la glucosa era consumido por los hongos en los matraces que se trataron con 0,25 U/ml o 0,125 U/ml con indiferencia del periodo de acondicionamiento. El matraz de control que no había sido tratado con lacasa exhibía el crecimiento más lento.

8. EQUIVALENTES

La presente invención no debe considerarse limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas que se ofrecen como simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para acondicionamiento de una biomasa lignocelulósica para uso como material de alimentación para un microorganismo de producción que produce una proteína deseada, comprendiendo dicho método proporcionar una composición que comprende una biomasa lignocelulósica, poner en contacto dicha composición con una enzima oxidante de los fenoles durante un periodo de tiempo suficiente para acondicionar dicha composición, en donde la tasa de crecimiento de dicho microorganismo de producción cultivado en dicha composición acondicionada se incrementa con relación a la de una composición que comprende una biomasa lignocelulósica que no se puso en contacto con dicha enzima, y en donde dicha biomasa lignocelulósica comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido.
2. Un método para cultivo de un microorganismo de producción que produce una proteína deseada, comprendiendo dicho método poner en contacto una composición que comprende una biomasa lignocelulósica con una enzima oxidante de los fenoles durante un periodo de tiempo suficiente para acondicionar dicha composición para crecimiento microbiano, y dejar crecer dichos microorganismos en dicha composición acondicionada, en donde la tasa de dicho microorganismo cultivado en dicha composición acondicionada se incrementa con relación a la de una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no se puso en contacto con dicha enzima, y en donde dicha biomasa lignocelulósica comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido.
3. Un método para producción de una proteína deseada, comprendiendo dicho método cultivar un microorganismo que produce dicha proteína en una composición que comprende una biomasa lignocelulósica que está acondicionada para crecimiento microbiano, en donde dicha composición acondicionada se ha puesto en contacto con una enzima oxidante de los fenoles durante un periodo de tiempo suficiente para acondicionar dicha composición, y en donde la tasa de crecimiento de dichos microorganismos cultivados en dicha composición acondicionada se incrementa con relación a la de una composición que comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido puesta en contacto por dicha enzima, y en donde dicha biomasa lignocelulósica comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento ácido.
4. El método de la reivindicación 1, 2, ó 3, en donde dicha biomasa lignocelulósica comprende biomasa lignocelulósica que no ha sido sometida a pretratamiento con álcali.
5. El método de la reivindicación 1, 2, ó 3, en donde dicha biomasa lignocelulósica comprende biomasa lignocelulósica no leñosa.
6. El método de la reivindicación 6, en donde dicha biomasa lignocelulósica no leñosa se selecciona de la lista constituida por paja de trigo, paja de avena, paja de arroz, paja de cebada, paja de centeno, paja de lino, bagazo de caña de azúcar, forraje de maíz, tallos de maíz, carozos de maíz, vainas de maíz, pulpa de remolacha azucarera, hierbas de pradera, hierba de tallo azul grande, hierba de tallo azul pequeña, hierba índica, mijo perenne, hierba gama, y carricera.
7. El método de la reivindicación 1, 2, ó 3, en donde dicha enzima oxidante de los fenoles se selecciona de la lista constituida por una lacasa, una bilirrubina-oxidasa, una fenol-oxidasa, y una catecol-oxidasa.
8. El método de la reivindicación 8, en donde dicha enzima oxidante de los fenoles es una lacasa producida en una especie de *Stachybotrys* o una especie de *Trichoderma*.
9. El método de la reivindicación 1, 2, ó 3, en donde dicho microorganismo es una especie de *Trichoderma*.
10. El método de la reivindicación 3, en donde el método comprende adicionalmente recuperar la proteína deseada de dichos microorganismos y/o dicha composición acondicionada.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 11, en donde dicha proteína deseada es una enzima.
12. El método de la reivindicación 12, en donde dicha enzima es una celulasa.
13. El método de la reivindicación 1, 2, ó 3, en donde dicha biomasa lignocelulósica es forraje de maíz que no ha sido pretratado con ácido, dicha enzima oxidante de los fenoles comprende una lacasa producida por una primera especie de *Trichoderma* o una especie de *Stachybotrys*, y dicho microorganismo cultivado en dicha composición es una segunda especie de *Trichoderma*.
14. El método de la reivindicación 14, en donde dicha primera especie de *Trichoderma* es *Trichoderma piluliferum*, dicha segunda especie de *Trichoderma* es *Trichoderma reesei*, y dicha proteína deseada es una celulasa.

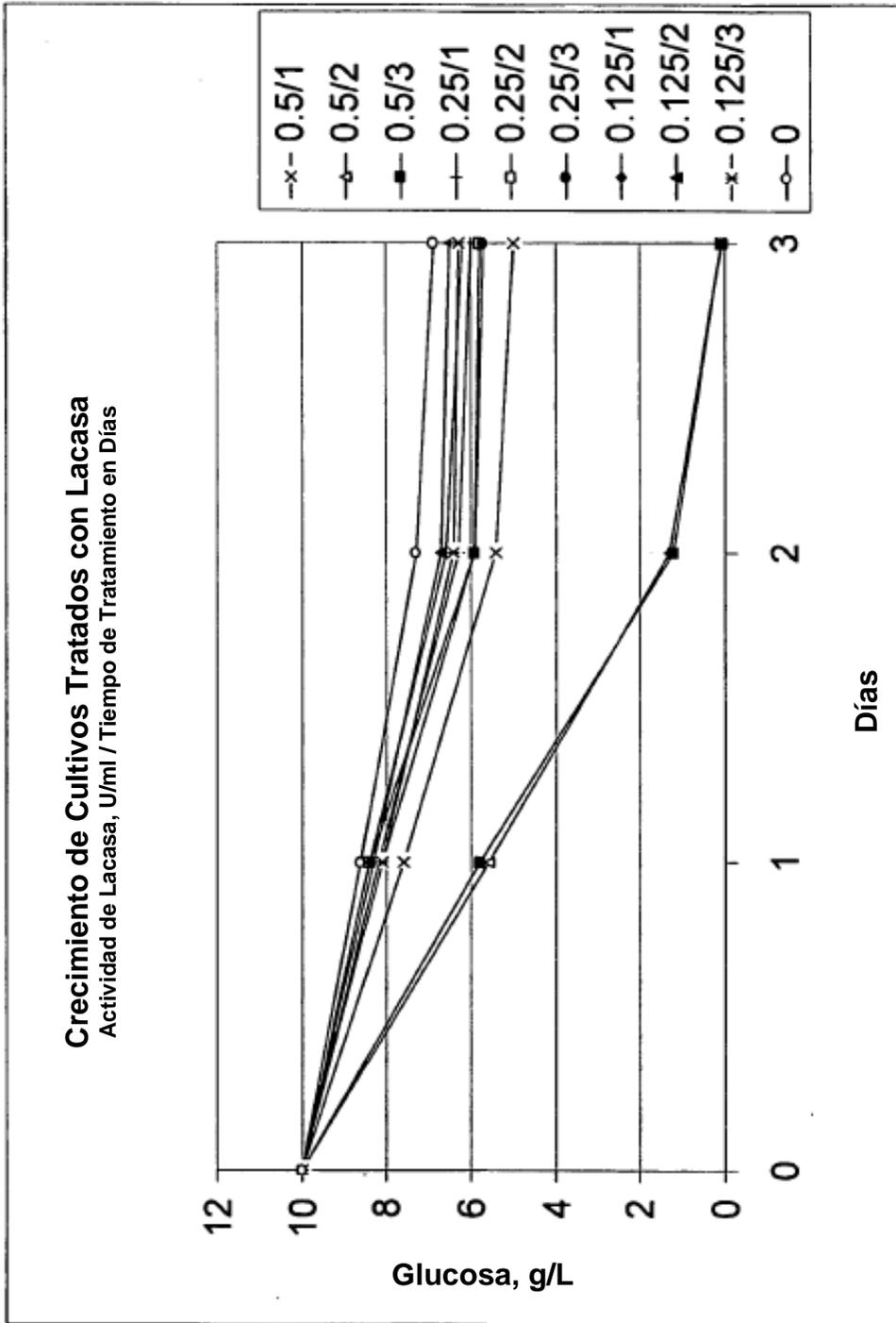


FIGURA 1