

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 269**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2008** **E 08878916 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016** **EP 2360245**

54 Título: **Procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasa, y medio de cultivo líquido**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2016

73 Titular/es:

ASAHI GROUP HOLDINGS, LTD. (100.0%)
23-1, Azumabashi 1-chome, Sumida-ku
Tokyo, 130-8602, JP

72 Inventor/es:

FUKUDA, KAZURO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 568 269 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasa, y medio de cultivo líquido

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir β -glucanasa y xilanasa.

5 **Antecedentes de la técnica**

Para poder utilizar eficazmente los recursos celulósicos, en los últimos años se ha explorado un procedimiento para descomponer eficazmente la celulosa. En la naturaleza, la celulosa se descompone principalmente por microorganismos, y se sabe que diversos microorganismos tales como bacterias y hongos producen enzimas celulíticas.

10 Estos microorganismos secretan las enzimas celulíticas fuera de su organismo, y la celulosa se descompone por su acción en glucosa a través de, principalmente, cello-oligosacáridos y celobiosa. Las enzimas celulíticas se denominan generalmente celulasas.

15 Cuando se pretende producir celulasa artificialmente, el género *Trichoderma* es un microorganismo conocido que secreta celulasa y es ampliamente utilizado. Además, se conoce también un procedimiento para secretar celulasa cultivando los microorganismos clasificados en el género *Trichoderma* utilizando un medio de cultivo que contiene nutrientes tales como fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno.

20 Sin embargo, en el procedimiento convencional para producir celulasa, los materiales que se pueden utilizar como fuente de carbono están limitados. Por ejemplo, las celulosas cristalinas son caras. Incluso aunque existan recursos celulósicos que son baratos, estos suelen requerir pretratamientos tales como tratamiento térmico o tratamiento alcalino, y dan lugar a costes relativamente altos.

25 Por ejemplo, la bibliografía de patente 1 describe un sustrato para producir celulasa capaz de inocular microorganismos productores de celulasa hirviendo papel usado en una solución de sulfato ferroso. Además, la bibliografía de patente 2 describe un procedimiento para producir un sustrato para producir celulasa capaz de inocular *Trichoderma reesei*, que es un microorganismo productor de celulasa, hirviendo bagazo finamente molido con álcali cáustico y posterior tratamiento con una solución de hipoclorito.

Además, la celulasa obtenida por estos medios convencionales contiene principalmente β -glucanasa, tiene baja actividad de xilanasa, y tiene una mala capacidad de descomponer un recurso celulósico que contenga xilano, tal como bagazo y paja de arroz. Por tanto, es menos eficaz para el fin de utilizar eficazmente diversos recursos celulósicos de origen natural.

30 La bibliografía de patente 3 describe un procedimiento para producir xilanasa cultivando un microorganismo clasificado bajo el género *Trichoderma* utilizando un fluido residual de destilación de alcohol diluido de centeno sometido a tratamiento preliminar tal como la eliminación de constituyentes sólidos, concentración de componentes no volátiles o tratamiento en autoclave del concentrado.

35 Sin embargo, el centeno utilizado como fuente de carbono en esta tecnología es difícil de obtener, y requiere un pretratamiento complicado que ocasiona costes elevados. Además, la cantidad de producción de β -glucanasa es incluso menor con este procedimiento.

La bibliografía no de patente 1 muestra que la productividad de celulasa es baja en el ensayo de producción de enzimas de *Trichoderma reesei* (papel de periódico y de oficina) que no se ha sometido a pretratamiento tal como tratamiento térmico o tratamiento alcalino.

40 La bibliografía no de patente 2 describe la producción de endo-1,4- β -glucanasa y xilanasa inmovilizadas con redes de nailon y exentas de *Trichoderma reesei*.

Nunca se ha conocido un ejemplo satisfactorio que pueda producir gran cantidad de β -glucanasa y xilanasa al mismo momento utilizando un papel que no se haya sometido a tratamiento térmico ni a tratamiento alcalino como recurso celulósico.

45 [Bibliografía de patente 1] Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público N.º 2003-137901
 [Bibliografía de patente 2] Publicación de patente japonesa N.º H5(1993)-33984
 [Bibliografía de patente 3] Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público N.º H11(1999)-113568
 [Bibliografía no de patente 1] Applied Biochemistry and Biotechnology pp. 237-245, Vol. 84-86, 2000
 [Bibliografía no de patente 2] Enzyme and Microbial Technology pp. 495-501, Vol. 18, 1996

50 **Divulgación de la invención****Problemas que va a resolver la invención**

La presente invención resuelve los anteriores problemas convencionales, y su objetivo es producir celulosa que tenga excelente capacidad para descomponer un recurso celulósico que contenga xilano a bajo coste.

Medios para resolver el problema

5 La presente invención proporciona un procedimiento para producir β -glucanasa y xilanasa que comprende la etapa de cultivar un microorganismo clasificado bajo el género *Trichoderma* utilizando un medio de cultivo líquido que contiene (a) una pulpa derivada de un papel que no se ha sometido a tratamiento térmico ni a tratamiento alcalino como fuente de carbono y (b) un nitrógeno amónico o un nitrógeno de amino como fuente de nitrógeno, en el que la concentración del nitrógeno amónico o el nitrógeno de amino en el medio de cultivo líquido es de 35 a 660 mmol/l, en el que el nitrógeno se refiere al nitrógeno contenido en amoníaco o a una sal de amonio derivada de amoníaco, y el nitrógeno de amino se refiere al nitrógeno contenido en una amina o un compuesto amino derivado de una amina.

En una realización, la concentración de la pulpa en el medio de cultivo líquido no es inferior al 2 % en p/v.

En una realización, la concentración inicial de la pulpa en el medio de cultivo líquido es del 2 al 7 % en p/v.

En una realización, la concentración inicial del nitrógeno amónico o del nitrógeno de amino en el medio de cultivo líquido no es inferior a 50 mM.

15 En una realización, la concentración inicial del nitrógeno amónico o del nitrógeno de amino en el medio de cultivo líquido es de 50 a 660 mM, tal como de 50 a 580 mM.

En una realización, el papel es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en papel de alta calidad, papel de pasta mecánica, papel para copias, papel de periódico y cartón.

El microorganismo clasificado bajo el género *Trichoderma* es *Trichoderma reesei*.

20 En una realización, la pulpa se añade al medio de cultivo líquido durante el cultivo.

Efectos de la invención

En la presente invención, como se pueden usar papeles sin tratar como fuente de carbono de un medio de cultivo líquido, es de bajo coste y bajo requerimiento energético y tiene un bajo impacto en el medio ambiente. Además, como la β -glucanasa y la xilanasa pueden tener una producción muy alta como celulosa al mismo tiempo, resulta muy útil para glicosilar recursos celulósicos naturales que contienen xilano tales como bagazo y paja de arroz. Específicamente, es útil para la producción de etanol a partir de biomasa que produce etanol a partir de un recurso celulósico.

Mejor realización para llevar a cabo la invención

Medio de cultivo líquido

30 El medio de cultivo líquido descrito en el presente documento es un material que contiene nutrientes donde crece un microorganismo clasificado bajo el género *Trichoderma*. El medio de cultivo líquido se prepara a partir de un medio de cultivo líquido obtenido disolviendo y suspendiendo la siguiente composición del medio de cultivo en 100 ml de agua (denominado generalmente medio de Mandel), y contiene pulpa como fuente de carbono y un nitrógeno amónico o un nitrógeno de amino como fuente de nitrógeno. Se muestra a continuación un ejemplo de una composición de medio preferida.

35 Contiene celulosa cristalina (fabricada por Fluka BioChemika, Nombre comercial: Avicel PH101): 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,14 g, KH_2PO_4 : 1,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,03 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,03 g, licor de maíz fermentado: 2 ml, Tween 80: 0,1 ml, solución de elementos traza (solución de H_3BO_4 6 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 26 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg): 0,1 ml, y agua: 100 ml (ajustada a pH 4,8 con ácido fosfórico o hidróxido de sodio)

La pulpa se refiere a las fibras usadas como materia prima para fabricar papel. El tipo de pulpa es preferentemente una pulpa con una pureza en celulosa elevada tal como una pulpa química y una pulpa de papel usado. La pulpa preferida es una pulpa derivada de papeles, que se puede obtener dividiendo y cortando papeles.

45 Los ejemplos específicos de papel preferido incluyen papel de alta calidad, papel de pasta mecánica, papel para copias, papel de periódico, cartón, y similares. Los papeles pueden ser aquellos que contienen la pulpa preferida, y también pueden ser papel impreso o papel escrito o un papel generalmente denominado como papel usado. Por ejemplo, se pueden usar también una página de papel de un libro viejo, una revista y un bloc de notas muy gastado, volantes, sobres, papel de carta, tarjetas postales, pañuelos de papel, y similares.

50 La concentración de la pulpa en el medio de cultivo líquido no es inferior preferentemente a un 2 % en p/v. Cuando la concentración de la pulpa es inferior a un 2 % en p/v, la cantidad de producción de la celulosa, especialmente de β -glucanasa, puede no aumentar demasiado.

Cuanto mayor sea la concentración de la pulpa en el medio de cultivo líquido, mejor. En otras palabras, el límite superior es la cantidad límite que se puede tratar agitando y mezclando el medio de cultivo líquido. Para facilitar la agitación y la mezcla del medio de cultivo líquido, se prefiere que los papeles se corten con una trituradora y se usen. Por ejemplo, el límite superior de la concentración inicial de la pulpa en el medio de cultivo líquido puede ser 20, 15 o 10 % en p/v dependiendo del comportamiento del agitador. En general, el intervalo preferido de la concentración inicial de la pulpa es del 2 al 7 % en p/v y preferentemente del 3 a 5 % en p/v.

El nitrógeno amónico se refiere al nitrógeno contenido en el amoníaco o en una sal de amonio derivada de amoníaco. Además, el nitrógeno de amino se refiere al nitrógeno contenido en una amina o en un compuesto de amino derivado de amina. Los ejemplos de compuestos que contienen nitrógeno amónico o nitrógeno de amino son sulfato de amonio, nitrato de amonio, fosfato de diamonio, cloruro de amonio, solución acuosa de amoníaco, urea, aminoácidos, y sus sales (por ejemplo, glutamato de sodio).

Entre estos, el compuesto especialmente preferible para su uso como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo líquido descrito en el presente documento es sulfato de amonio. El motivo es que es de bajo coste y está fácilmente disponible.

La concentración del nitrógeno amónico o del nitrógeno de amino en el medio de cultivo líquido es de 35 a 660 mM como número de moles de amonio. Preferentemente, la concentración es de 50 a 580 mM. Cuando la concentración es inferior a 35 mM, la cantidad de producción de la celulasa, especialmente de β -glucanasa, puede no aumentar demasiado. Además, cuando la concentración inicial excede de 660 mM, la productividad de las enzimas disminuye. Además, es preferible aumentar o disminuir la concentración del nitrógeno amónico o del nitrógeno de amino en el medio de cultivo líquido dependiendo de la concentración de la pulpa en el medio de cultivo líquido y, por ejemplo, cuando la concentración de la pulpa es del 3 % en p/v, es preferible 50 mM cuando se tienen en cuenta el coste y otros aspectos similares.

Procedimiento para producir β -Glucanasa y xilanasa

Se sabe que los hongos del género *Trichoderma* producen celulasas necesarias para la glicosilación de la celulosa. El microorganismo clasificado bajo el género *Trichoderma* utilizado en la presente invención no está particularmente limitado siempre que pueda producir celulasa. El microorganismo preferido clasificado bajo el género *Trichoderma* es *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*. De forma particularmente preferente, el microorganismo es *Trichoderma reesei*.

Se describen las propiedades micológicas de los hongos *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride* en, por ejemplo, E.G. Simmons, Abst. 2nd International Mycological Congress, Tampa, Florida, EE.UU., agosto de 1977, página 618.

Se usa un dispositivo convencional de cultivo mediante aireación-agitación para cultivo líquido, y se cultiva a una temperatura de cultivo de 20° a 33 °C, y preferentemente de 28 °C a 30 °C, a un pH de cultivo de 4 a 6 durante 4 a 10 días, utilizando el medio de cultivo líquido anteriormente descrito. Se puede añadir pulpa al medio de cultivo líquido durante el cultivo. Puede darse el caso en el que la eficacia de producción de la celulasa mejore aportando una fuente de carbono adicional ya que la pulpa del medio de cultivo se descompone a medida que avanza el cultivo. Cuando se añade pulpa, la forma de la adición puede ser continua o discontinua, y el tiempo y la cantidad de la adición se pueden ajustar de tal manera que la agitación y la mezcla sean posibles incluso después de la adición de la pulpa.

Cuando se añade pulpa, el nitrógeno amónico o el nitrógeno de amino pueden añadirse adecuadamente según sea necesario.

Posteriormente, si es necesario, se retira el organismo fúngico de este fluido de cultivo mediante un procedimiento conocido tal como centrifugación y filtración, para obtener el fluido sobrenadante del cultivo de los hongos del género *Trichoderma*. El fluido del cultivo o fluido sobrenadante del cultivo de los hongos del género *Trichoderma* contiene la celulasa prevista, en otras palabras, β -glucanasa y xilanasa, a concentración elevada.

La actividad β -glucanasa del fluido de cultivo obtenido o del fluido del sobrenadante del cultivo no es inferior a 30 U/ml, preferentemente no inferior a 50 U/ml, más preferentemente no inferior a 60 U/ml, y preferentemente además no inferior a 70 U/ml. Asimismo, la actividad xilanasa del fluido de cultivo obtenido o del fluido del sobrenadante del cultivo no es inferior a 25 U/ml, preferentemente no inferior a 30 U/ml, más preferentemente no inferior a 40 U/ml, y preferentemente además no inferior a 50 U/ml. Cuando la actividad β -glucanasa o la actividad xilanasa del fluido de cultivo o del fluido sobrenadante del cultivo disminuye hasta menos del límite inferior anterior, el efecto sobre el fin del uso eficaz de diferentes recursos celulósicos naturales disminuye.

Se puede cuantificar la anterior actividad hemicelulasa basándose en el aumento de la absorbancia a 540 nm haciendo reaccionar un azúcar reductor producido mediante hidrólisis enzimática utilizando xilano derivado de cascarillas de avena como sustrato con DNS.

Más específicamente, se añaden 0,1 ml de fluido de cultivo o fluido de sobrenadante de cultivo a 1,9 ml de una solución de sustrato de xilano al 1 % (Xylan, procedente de cascarillas de avena, fabricado por Sigma disuelto en

una solución tampón de ácido acético 200 nM (pH 4,5)), y la reacción enzimática se llevó a cabo con precisión durante 10 minutos a 40 °C. Posteriormente, 4 ml de un reactivo DNS (que contenía 0,75 % de ácido dinitrosalicílico, 1,2 % de hidróxido de sodio, 22,5 % de tartrato de sodio potasio tetrahidratado, y 0,3 % de lactosa monohidratada) se añadieron a lo anterior y se mezclaron bien, para detener la reacción. Para cuantificar la cantidad de azúcar reductor contenida en la solución de detención de la reacción, la solución de detención de la reacción se calienta en un baño de agua en ebullición exactamente durante 15 minutos. Posteriormente, la solución de detención de la reacción se enfría a temperatura ambiente, y a continuación se determina la absorbancia a 540 nm para cuantificar como la cantidad de azúcar reductor correspondiente a xilosa. 1 unidad de la actividad hemicelulasa se representa como el nivel de enzima que produce un azúcar reductor que corresponde a 1 μ mol de xilosa en 1 minuto en las condiciones de reacción a 40°C durante 10 minutos.

Procedimiento para descomponer o glicosilar recursos celulósicos

La β -glucanasa y la xilanasa obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención son útiles para descomponer o glicosilar recursos celulósicos. Los recursos celulósicos citados en el presente documento pueden ser recursos tanto de celulosa sintética como de celulosa natural. La celulosa sintética representa una celulosa distribuida como polvo de celulosa. Los recursos celulósicos naturales incluyen bagazo, paja de arroz, paja de trigo, cerveza de barril, madera, y similares. La presente invención puede producir mucha β -glucanasa y xilanasa al mismo tiempo y es por tanto excelente, en particular, para la glicosilación de recursos celulósicos naturales tales como bagazo, paja de arroz, paja de trigo, y cerveza de barril.

Se puede usar un procedimiento conocido como procedimiento para descomponer o glicosilar un recurso celulósico, y no está particularmente limitado. Un ejemplo incluye un procedimiento de suspender un recurso celulósico como sustrato en un medio acuoso, añadir el fluido de cultivo anteriormente descrito o el fluido del sobrenadante del cultivo a lo anterior, y calentar agitando o sacudiendo a la vez, para llevar a cabo la reacción de glicosilación. En lugar del fluido de cultivo anteriormente descrito o del fluido del sobrenadante del cultivo que muestra actividad celulolítica, se puede usar su materia seca o una solución obtenida dispersando o disolviendo la materia seca en agua.

Se prefiere que la materia bruta celulósica sea previamente deslignificada. Las condiciones de reacción tales como el procedimiento de suspensión, el procedimiento de agitación, el procedimiento de añadir la solución mixta anterior, el orden de adición, y sus concentraciones se ajustan adecuadamente de tal manera que se obtenga la glucosa con un rendimiento mayor.

El pH y la temperatura de la solución de reacción en ese momento deben estar comprendidos en el intervalo en el que la enzima no está inactivada, y por lo general, cuando la reacción se lleva a cabo a presión ordinaria, la temperatura debe estar en el intervalo de 30 °C a 70 °C y el pH debe estar en el intervalo de 3 a 7. Además, aunque la presión, la temperatura y el pH se ajusten también adecuadamente de tal manera que se obtenga la glucosa a mayor rendimiento que el descrito anteriormente, se prefiere llevarlo a cabo en una solución tampón de ácido acético o fosfato a presión ordinaria a una temperatura en el intervalo de 50 °C a 60 °C y a un pH en el intervalo de 4 a 6. El tiempo de reacción es generalmente de 6 a 147 horas, y preferentemente de 24 a 72 horas.

Se obtiene una solución acuosa mediante glicosilación de la celulosa. La solución acuosa obtenida se puede someter a tratamiento de purificación tal como decoloración, desalinización, y eliminación de la enzima según sea necesario. El procedimiento de purificación no está particularmente limitado siempre que sea un procedimiento conocido y, por ejemplo, se puede usar un tratamiento con carbón activado, tratamiento con resina de intercambio iónico, tratamiento de cromatografía, tratamientos de filtración tales como microfiltración, ultrafiltración y filtración mediante ósmosis inversa, tratamiento de cristalización, y similares, y estos procedimientos se pueden usar solos o en combinación de 2 o más tipos.

La solución acuosa principalmente compuesta por una glucosa purificada mediante el procedimiento anterior se puede usar tal cual, y se puede solidificar mediante secado según sea necesario. El procedimiento de secado no está particularmente limitado siempre que sea un procedimiento conocido y, por ejemplo, secado por pulverización, criodesecación, secado en tambor, secado en película fina, secado en bandeja, secado ultrarrápido, secado al vacío, y similares, y estos procedimientos se pueden usar solos o en combinación de 2 o más tipos.

Ejemplos

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se va a describir más específicamente mediante la referencia a los ejemplos, pero la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas. Celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, se sustituyó con un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml), y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 15 mM, 35 mM, 50 mM, 65 mM, 80 mM, 100 mM o 115 mM y se ajustó a pH 4,8 con ácido fosfórico e hidróxido de sodio, para preparar 100 ml de un medio de cultivo líquido en un matraz Erlenmeyer de un volumen de 500 ml con deflectores. Se inoculó un asa

de siembra del *Trichoderma reesei* cultivado en este medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa del fluido sobrenadante. El papel para copias no se sometió a pretratamiento tal como tratamiento alcalino o tratamiento térmico, y solamente se cortó en trozos de 2 mm x 7 mm con una trituradora (desk purser DS-4100 de CARL) y se utilizó.

(Determinación de la actividad enzimática)

Se determinó la actividad enzimática del fluido de cultivo obtenido anteriormente.

Para la actividad β -glucanasa, se determinó la absorbancia del fragmento coloreado generado mediante descomposición enzimática utilizando β -glucano marcado con colorante como un sustrato utilizando el kit de ensayo de la β -glucanasa fabricado por Megazyme. Específicamente, 0,1 ml del fluido de cultivo se añadieron a 0,1 ml de solución de sustrato de azo-glucano de cebada, y la reacción enzimática se llevó a cabo con precisión durante 10 minutos a 40 °C. Posteriormente, 0,6 ml de una solución de detención [que contenía 4 % de acetato sódico, 0,4 % de acetato de cinc, y 80 % de cellosolve de metilo (pH 5)] se añadieron al anterior y se dejaron durante 5 minutos para detener la reacción. Posteriormente, se centrifugó la solución, y posteriormente se determinó la absorbancia del fluido sobrenadante a 590 nm. Se representó 1 unidad de la actividad β -glucanasa como el nivel de enzima que produce un azúcar reductor que corresponde a 1 μ mol de glucosa en 1 minuto en las condiciones de reacción a 40°C durante 10 minutos.

A continuación, se cuantificó la actividad xilanasa mediante el aumento de la absorbancia a 540 nm haciendo reaccionar un azúcar reductor producido mediante hidrólisis enzimática utilizando xilano derivado de cascarillas de avena como sustrato con DNS. Más específicamente, se añadieron 0,1 ml de fluido de cultivo a 1,9 ml de una solución de sustrato de xilano al 1 % [Xylan, procedente de cascarillas de avena, fabricado por Sigma disuelto en una solución tampón de ácido acético 200 mM (pH 4,5)], y la reacción enzimática se llevó a cabo con precisión durante 10 minutos a 40 °C. Posteriormente, 4 ml de un reactivo DNS (que contenía 0,75 % de ácido dinitrosalicílico, 1,2 % de hidróxido de sodio, 22,5 % de tartrato de potasio sodio tetrahidratado, y 0,3 % de lactosa monohidratada) se añadieron a lo anterior y se mezclaron bien, para detener la reacción. Para cuantificar la cantidad de azúcar reductor contenida en la solución de detención de la reacción, la solución de detención de la reacción se calentó en un baño de agua en ebullición exactamente durante 15 minutos. Posteriormente, la disolución de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y a continuación se determinó la absorbancia a 540 nm para cuantificar la cantidad de azúcar reductor correspondiente a la xilosa. 1 unidad de la actividad xilanasa se representó como el nivel de enzima que produce un azúcar reductor que corresponde a 1 μ mol de xilosa en 1 minuto en las condiciones de reacción a 40°C durante 10 minutos. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

Ejemplo 2

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de cartón (3 g/100 ml) en vez de celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Ejemplo 3

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel de periódico (3g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

Ejemplo 4

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y se añadió cloruro de amonio en vez de sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 20 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM o 120 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Ejemplo 5

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y se añadió fosfato diamónico en vez de sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 15 mM, 35 mM, 50 mM, 65 mM, 80 mM, 100 mM o 115 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* MM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Ejemplo 6

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y se añadió nitrato de amonio en vez de sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 12 mM, 24 mM, 36 mM, 48 mM, 60 mM, 72 mM o 84 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

Ejemplo 7

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y se añadió una solución acuosa de amoníaco en vez de sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de la misma pasó a ser cada una de 15 mM, 30 mM, 45 mM, 60 mM, 75 mM, 90 mM o 105 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 7.

Ejemplo 8

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y urea en vez de sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 17 mM, 33 mM, 50 mM, 67 mM, 83 mM o 100 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 8.

Ejemplo 9

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se añadió papel para copias en vez de celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, de tal manera que la concentración de la misma pasó a ser cada una de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, o 7 %, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar del nitrógeno amónico pasó a 80 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 9.

Ejemplo 10

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se añadió papel para copias en vez de celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, de tal manera que la concentración de la misma pasó a ser cada una de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, o 7 %, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar del nitrógeno amónico pasó a 160 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la

actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 10.

Ejemplo 11

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se añadió papel para copias en vez de celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, de tal manera que la concentración de la misma pasó a ser cada una de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, o 7 %, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar del nitrógeno amónico pasó a 320 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

Ejemplo 12

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se añadió papel para copias en vez de celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, de tal manera que la concentración de la misma pasó a ser cada una de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, o 7 %, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar del nitrógeno amónico llegó a 480 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 12.

Ejemplo de referencia 1

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se ajustó la concentración de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, al 1 %, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 15 mM, 35 mM, 50 mM, 65 mM, 80 mM, 100 mM o 115 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 13.

Ejemplo de referencia 2

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, de tal manera que la concentración de la misma pasó a ser cada una de un 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, o 4 %, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar del nitrógeno amónico pasó a 160 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 14.

Ejemplo de referencia 3

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se añadió un 1 % de papel para copias (3g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 15 mM, 35 mM, 50 mM, 65 mM, 80 mM, 100 mM o 115 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 15.

Ejemplo de referencia 4

De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se añadió un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y nitrato de potasio en vez de sulfato de amonio, se añadió una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM o 70 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido

y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 16.

Ejemplo 13

5 Se cultivó *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas. Se inoculó un asa de siembra del mismo en un matraz Erlenmeyer con un volumen de 500 ml con deflectores que contiene 100 ml de medio de Mandel y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 4 días. Este se inoculó en un matraz Erlenmeyer con un volumen de 500 ml con deflectores que
10 contiene 150 ml de medio de Mandel y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 2 días, para obtener un fluido de cultivo. 3 l de un medio de cultivo obtenido añadiendo un 3 % (30 g/l), 6 % (60 g/l) de papel para copias o bien un 3 % de celulosa cristalina (Avicel PH101) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, añadiendo sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser de 200 mM, y empleando 6 g/l Adekanol LG-126 (fabricado por ADEKA CORPORATION) en vez de Tween 80, y el fluido de cultivo se añadieron a un fermentador de 5 l (fabricado por B.E. MARUBISHI CO., LTD.), y la mezcla se cultivó a 28 °C. Se llevó a cabo con aireación de 1 WM y agitación a 450 rpm, y se ajustó el pH con hidróxido de sodio 2 N y ácido fosfórico diluido cinco veces con el fin de mantener constante un pH 4,8 durante el periodo de cultivo. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa del fluido sobrenadante. Los resultados se muestran en la Fig. 17.

20 El papel para copias se cortó en trozos de 4 mm x 30 mm con una trituradora (Primo1400 fabricada por Meikoshokai Co., Ltd.) y se usó. Además, se añadió un 6 % de papel para copias (60 g/l) en una cantidad total en un momento, la agitación resultó insuficiente y, por tanto, el papel para copias y el sulfato de amonio se añadieron en mitades en el día 1 y el día 3 del cultivo.

Ejemplo 14

25 De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 13, se añadió un 6 % (60 g/l) de papel para copias a un fermentador de 5 l, se añadió sulfato amónico de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser de 44 mM, 100 mM, 134 mM, o 224 mM, y se examinó la producción de enzimas. Los resultados se muestran en la Fig. 18.

Ejemplo 15

30 De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 13, se añadieron un 6 % de papel para copias (60 g/l) y sulfato de amonio a un fermentador de 5 l, de tal manera que la concentración molar del nitrógeno amónico pasó a ser de 45 mM, y se comparó la producción de las enzimas entre el caso en el que se empleó hidróxido sódico 2 N como producto químico para ajustar el pH durante el periodo de cultivo y en el caso en el que se empleó una solución acuosa de amoníaco al 18 %. La cantidad entrante de solución acuosa de amoníaco durante el periodo de cultivo en este momento fue 123 mM. Los resultados se muestran en la Fig. 19.

Ejemplo 16

35 De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y se añadió sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 330 mM, 420 mM, 500 mM, 580 mM, 660 mM, 720 mM o 800 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó
40 *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 20.

Ejemplo 17

45 De acuerdo con la misma manera que en el Ejemplo 1, se empleó un 3 % de papel para copias (3 g/100 ml) en vez de la celulosa cristalina, una fuente de carbono de medio de Mandel, y se añadió glutamato sódico en vez de sulfato de amonio, una fuente de nitrógeno, de tal manera que la concentración molar de nitrógeno amónico pasó a ser cada una de 17 mM, 33 mM, 50 mM, 67 mM, 83 mM o 100 mM para preparar un medio de cultivo líquido. Se cultivó
50 *Trichoderma reesei* QM9414 (NBRC 31329) en medio de agar de patata dextrosa a 28°C durante 7 días, para formar suficiente cantidad de esporas, y se inoculó un asa de siembra del mismo en el medio de cultivo líquido y se cultivó con agitación a 28 °C, 180 rpm durante 7 días. El fluido del cultivo se centrifugó en el día 7, y se determinaron la actividad β -glucanasa y la actividad xilanasa de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 21.

55

Ejemplo 18

Se llevó a cabo el ensayo de glicosilación de los recursos celulósicos utilizando cada fluido sobrenadante del medio de cultivo con un 6 % de papel para copias y el medio de cultivo con un 3 % de celulosa cristalina obtenida en el Ejemplo 13. Como recursos celulósicos sometidos a glicosilación, se utilizaron celulosa en polvo (fabricada por NIPPON PAPER CHEMICALS CO. LTD. Nombre comercial: KC FLOCK W-50), bagazo, paja de arroz, y cerveza de barril. El bagazo, la paja de arroz y la cerveza de barril se molieron cada uno finamente, se suspendieron en NaOH 0,3 N, se trataron a 120°C durante 15 minutos, se lavaron suficientemente con agua, posteriormente se secaron, se sometieron a tratamiento de deslignificación, y se sometieron a glicosilación. El polvo de celulosa se sometió directamente a glicosilación. Una solución (una solución del recurso celulósico al 8 %) que estaba compuesta por el recurso celulósico: 0,8 g, el fluido del sobrenadante del cultivo: 9 ml, y tampón de ácido acético 1 M (pH 4,8): 0,2 ml se agitó a 50 °C, pH 4,8 durante 48 horas para glicosilar, y se determinó la glucosa producida mediante el Glucose CII-Test Wako (Wako Pure Chemicals). En la Fig 22 a la Fig 25 se muestran los resultados.

Se ha mostrado a partir de los resultados de los Ejemplos y los Ejemplos de referencia que *Trichoderma reesei* se cultivó en un medio de cultivo líquido que contiene papel sin tratar como fuente de carbono y que contiene sales de amoníaco/amonio como fuente de nitrógeno para producir β -glucanasa y xilanasa al mismo tiempo con una productividad elevada. Se ha mostrado también que la cantidad de papel en el medio de cultivo se aumentó hasta un nivel de concentración mayor que el de una fuente de carbono usada normalmente, o bien se ajustó el contenido de amoníaco/sal amonio en el medio de cultivo a una concentración en el intervalo específico para aumentar la cantidad de producción de la celulasa notablemente. Se ha mostrado también que se pueden descomponer diversos recursos celulósicos y glicosilarse utilizando el fluido sobrenadante del cultivo resultante.

Aplicabilidad industrial

La β -glucanasa y la xilanasa que son extremadamente útiles para, en particular, la glicosilación de recursos celulósicos naturales tales como bagazo y paja de arroz, pueden producirse en gran cantidad al mismo tiempo, y se pueden utilizar en la producción de etanol a partir de la biomasa que produce etanol a partir de recursos celulósicos.

Breve descripción de los dibujos

- [Fig. 1] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de sulfato de amonio en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.
- [Fig. 2] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de sulfato de amonio en un medio de cultivo con un 3 % de cartón.
- [Fig. 3] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de sulfato de amonio en un medio de cultivo con un 3 % de papel de periódico.
- [Fig. 4] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de cloruro de amonio en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.
- [Fig. 5] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de fosfato diamónico en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.
- [Fig. 6] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de nitrato de amonio en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.
- [Fig. 7] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de amoníaco en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.
- [Fig. 8] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de urea en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.
- [Fig. 9] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de papel para copias en un medio de cultivo con 80 mM de sulfato de amonio.
- [Fig. 10] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de papel para copias en un medio de cultivo con 160 mM de sulfato de amonio.
- [Fig. 11] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de papel para copias en un medio de cultivo con 320 mM de sulfato de amonio.
- [Fig. 12] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de papel para copias en un medio de cultivo con 480 mM de sulfato de amonio.
- [Fig. 13] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de sulfato de amonio en un medio de cultivo con un 1 % de Avicel.
- [Fig. 14] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de Avicel en un medio de cultivo con 160 mM de sulfato de amonio.
- [Fig. 15] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de sulfato de amonio en un medio de cultivo con un 1 % de papel para copias.
- [Fig. 16] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de nitrato de potasio en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.
- [Fig. 17] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente al tipo de fuente de carbono en un medio de cultivo con 200 mM de sulfato de amonio.
- [Fig. 18] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de sulfato de amonio en un medio de cultivo con un 6 % de papel para copias usado.

[Fig. 19] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente al tipo de producto químico para ajustar el pH en un medio de cultivo con un 6 % de papel para copias usado y 45 mM de sulfato de amonio.

5 [Fig. 20] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de sulfato de amonio en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.

[Fig. 21] Una gráfica que muestra el cambio de la actividad enzimática de un fluido sobrenadante del cultivo frente a la concentración de glutamato sódico en un medio de cultivo con un 3 % de papel para copias.

10 [Fig. 22] Una gráfica que compara la concentración de la glucosa producida cuando se glicosila bagazo utilizando cada fluido sobrenadante del medio de cultivo con un 6 % del papel para copias y el medio de cultivo con un 3 % de celulosa cristalina obtenida en el Ejemplo 13.

[Fig. 23] Una gráfica que compara la concentración de la glucosa producida cuando se glicosila paja de arroz utilizando cada fluido sobrenadante del medio de cultivo con un 6 % de papel para copias y el medio de cultivo con un 3 % de celulosa cristalina obtenida en el Ejemplo 13.

15 [Fig. 24] Una gráfica que compara la concentración de la glucosa producida cuando se glicosila cerveza de barril utilizando cada fluido sobrenadante del medio de cultivo con un 6 % de papel para copias y el medio de cultivo con un 3 % de celulosa cristalina obtenida en el Ejemplo 13.

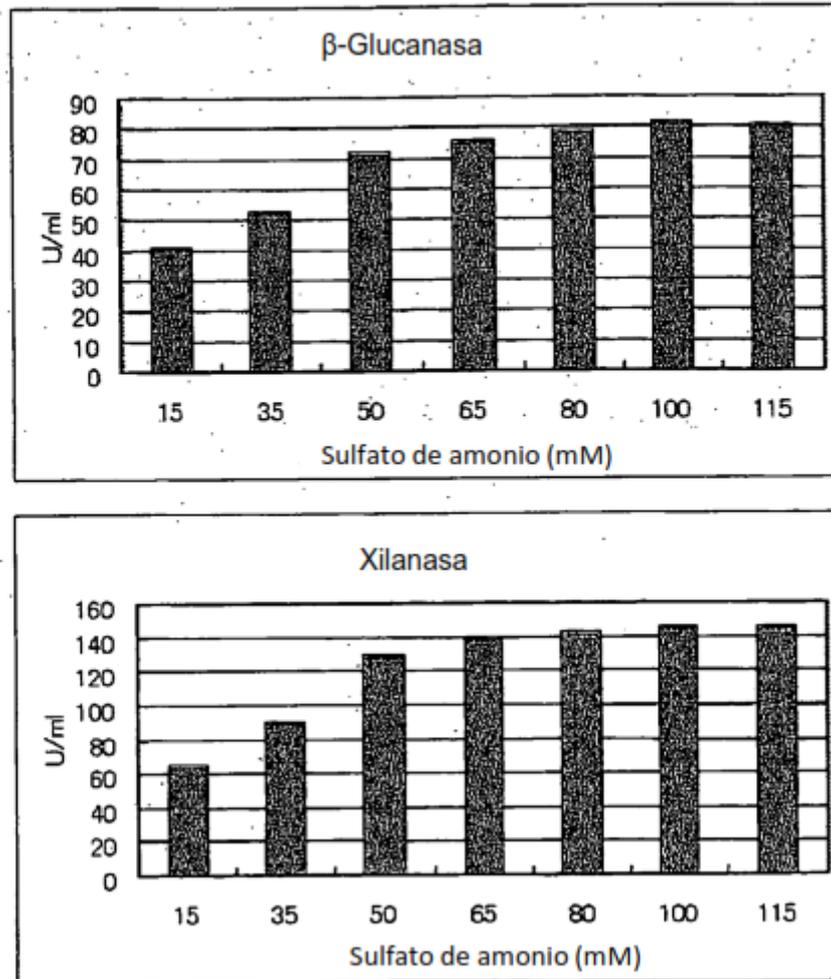
[Fig. 25] Una gráfica que compara la concentración de la glucosa producida cuando se glicosila polvo de celulosa utilizando cada fluido sobrenadante del medio de cultivo con un 6 % de papel para copias y el medio de cultivo con un 3 % de celulosa cristalina obtenida en el Ejemplo 13.

20

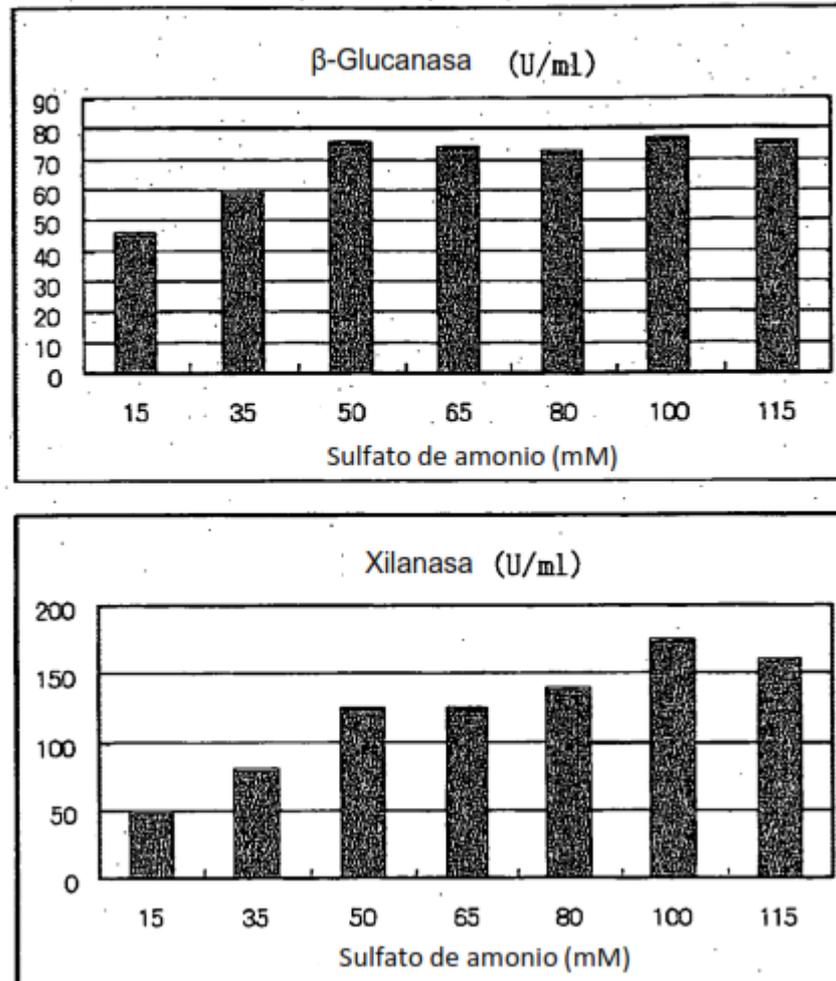
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasas que comprende la etapa de cultivar un microorganismo clasificado bajo el género *Trichoderma* utilizando un medio de cultivo líquido que contiene (a) una pulpa derivada de papel que no se ha sometido a tratamiento térmico ni a tratamiento alcalino como fuente de carbono y (b) un nitrógeno amónico o un nitrógeno de amino como fuente de nitrógeno,
5 en el que la concentración del nitrógeno amónico o el nitrógeno de amino en el medio de cultivo líquido es de 35 a 660 mmol/l,
en el que el nitrógeno amónico se refiere al nitrógeno contenido en amoníaco o una sal de amonio derivada de amoníaco, y el nitrógeno de amino se refiere al nitrógeno contenido en una amina o un compuesto amino derivado
10 de una amina,
en el que el microorganismo clasificado bajo el género *Trichoderma* es *Trichoderma reesei*.
2. El procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de la pulpa en el medio de cultivo líquido no es inferior a un 2 % en p/v.
3. El procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la
15 concentración inicial de la pulpa en el medio de cultivo líquido es de 2 a 7 % en p/v.
4. El procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración inicial del nitrógeno amónico o del nitrógeno de amino en el medio de cultivo líquido es de 50 a 580 mmol/l.
5. El procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones
20 1 a 4, en el que el papel es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en papel de alta calidad, papel de pasta mecánica, papel para copias, papel de periódico y cartón.
6. El procedimiento de producción de β -glucanasa y xilanasas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la pulpa se añade al medio de cultivo líquido durante el cultivo.

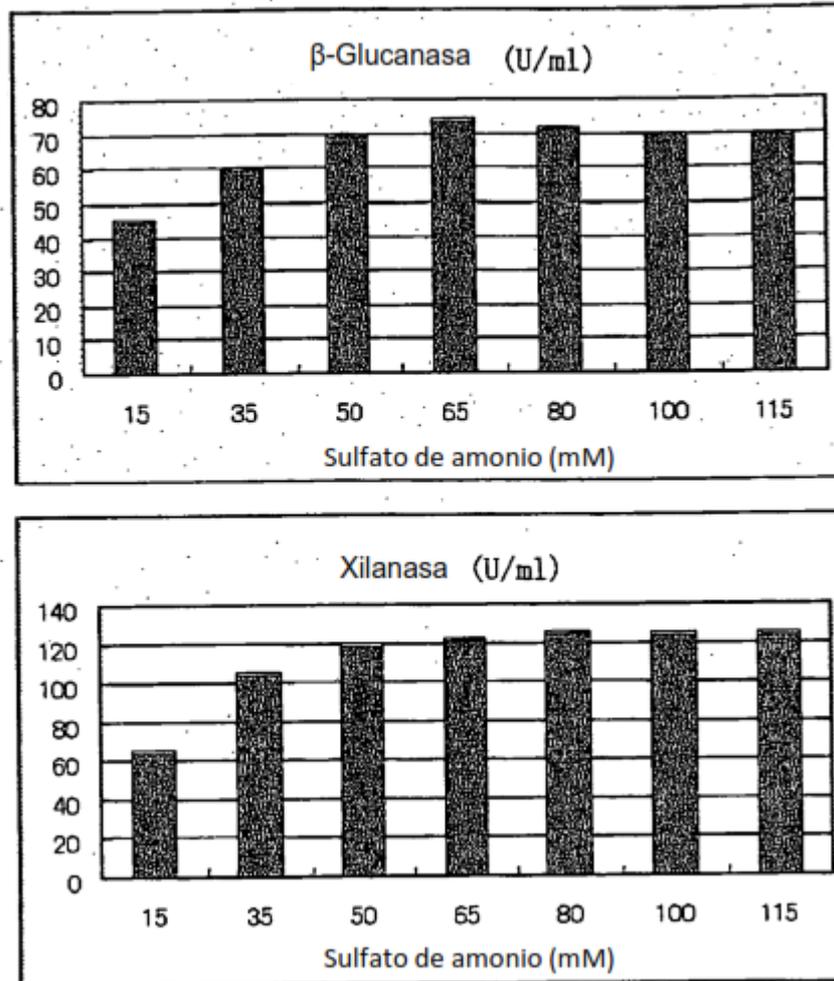
[Figura 1]



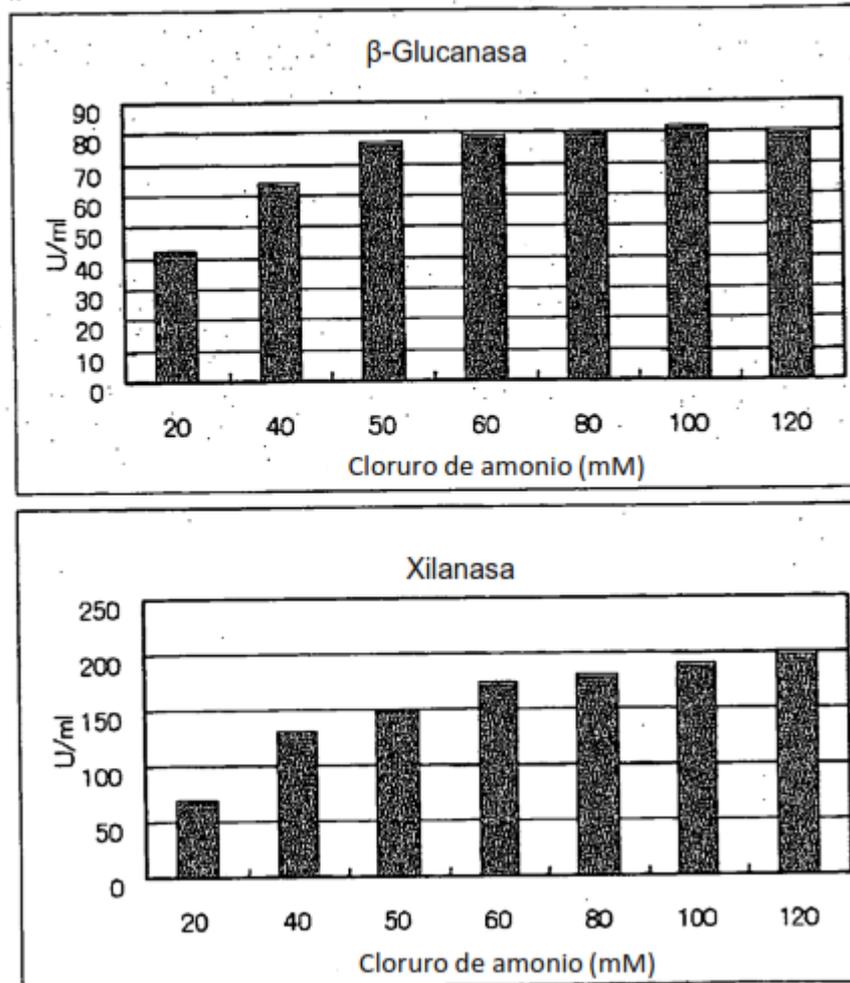
[Figura 2]



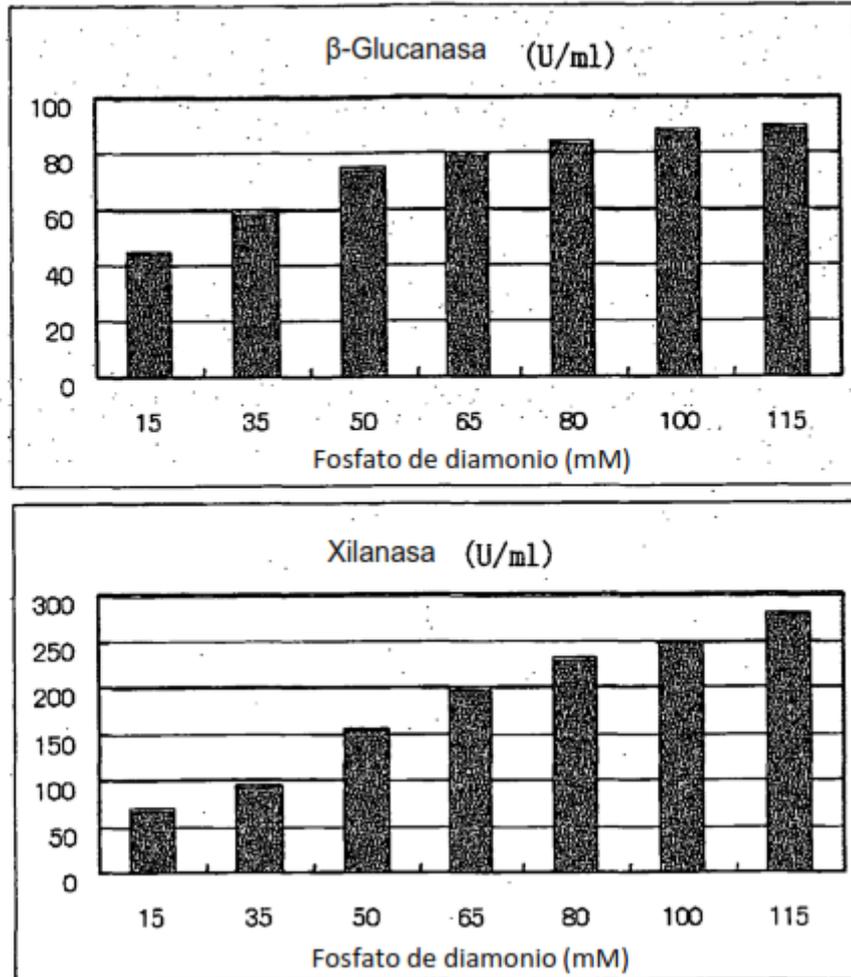
[Figura 3]



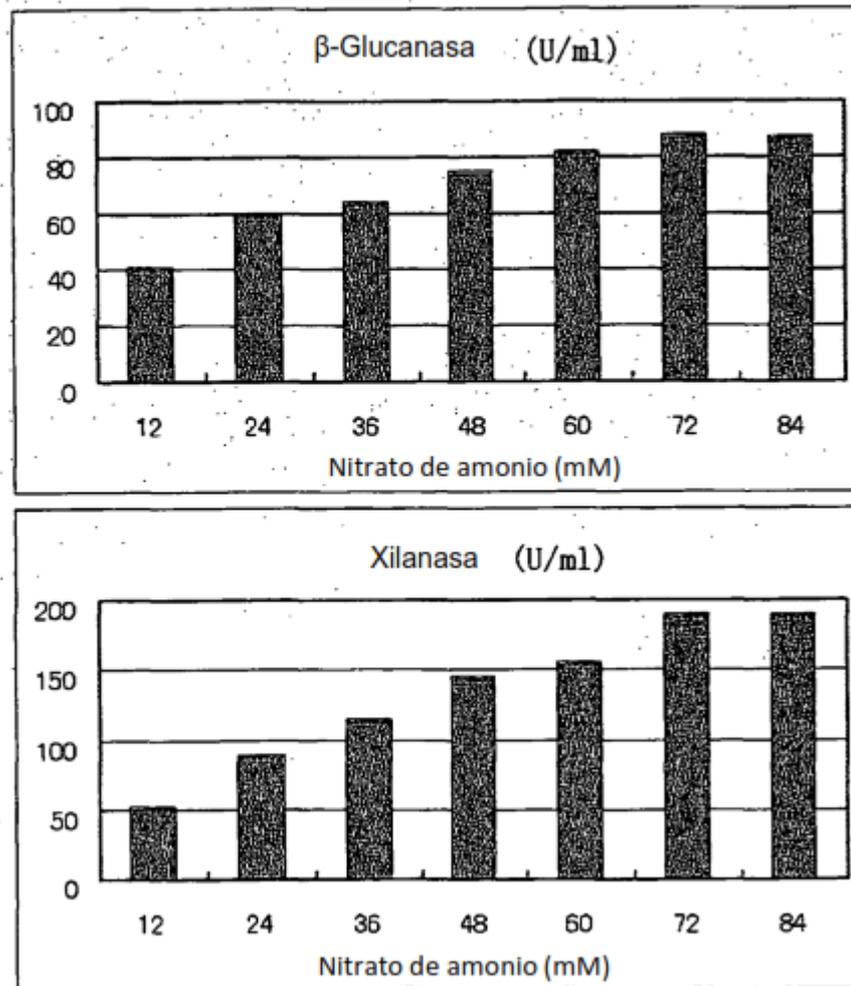
[Figura 4]



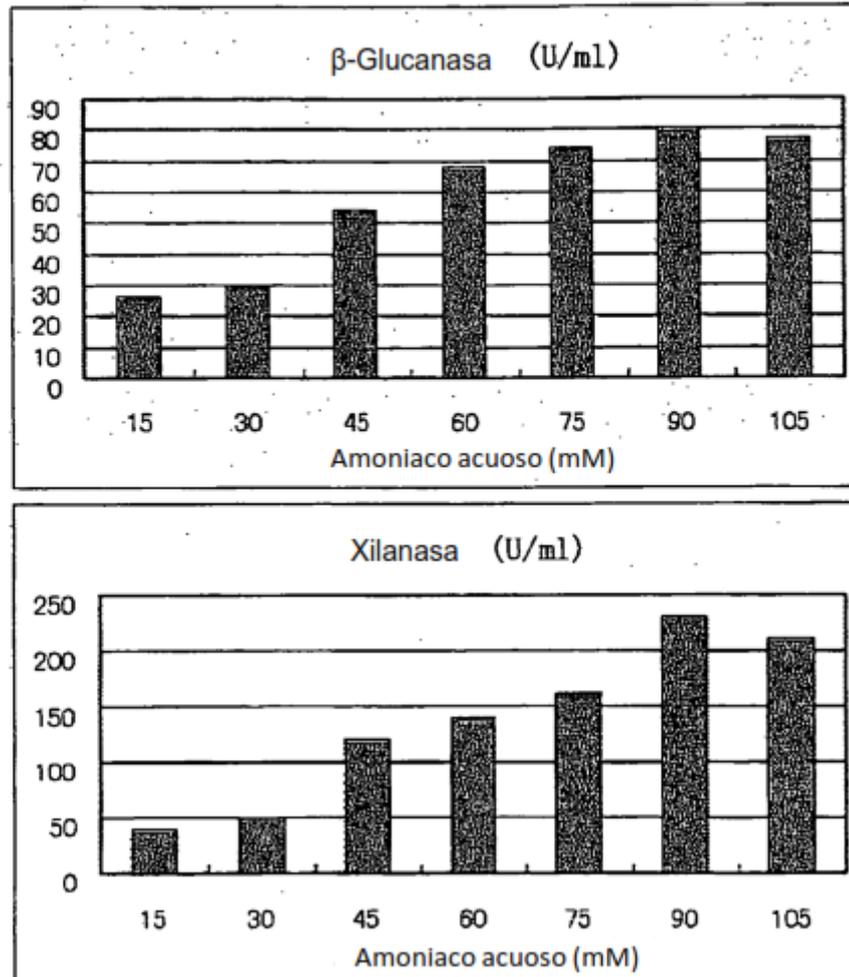
[Figura 5]



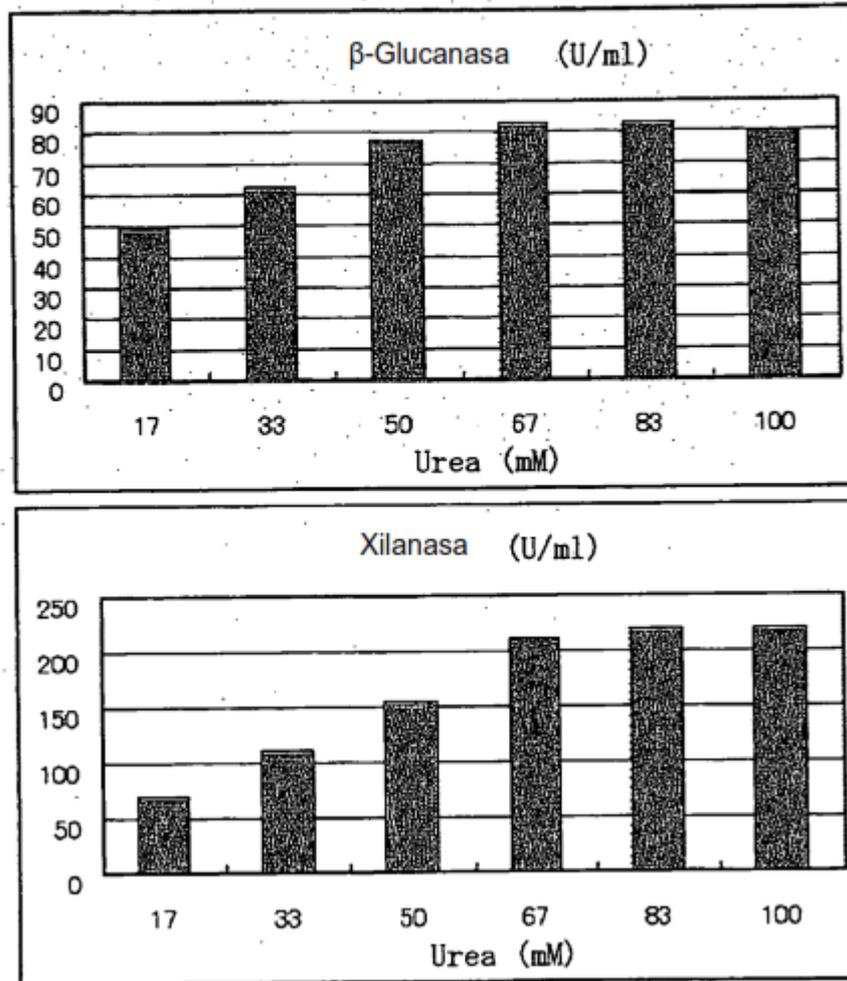
[Figura 6]



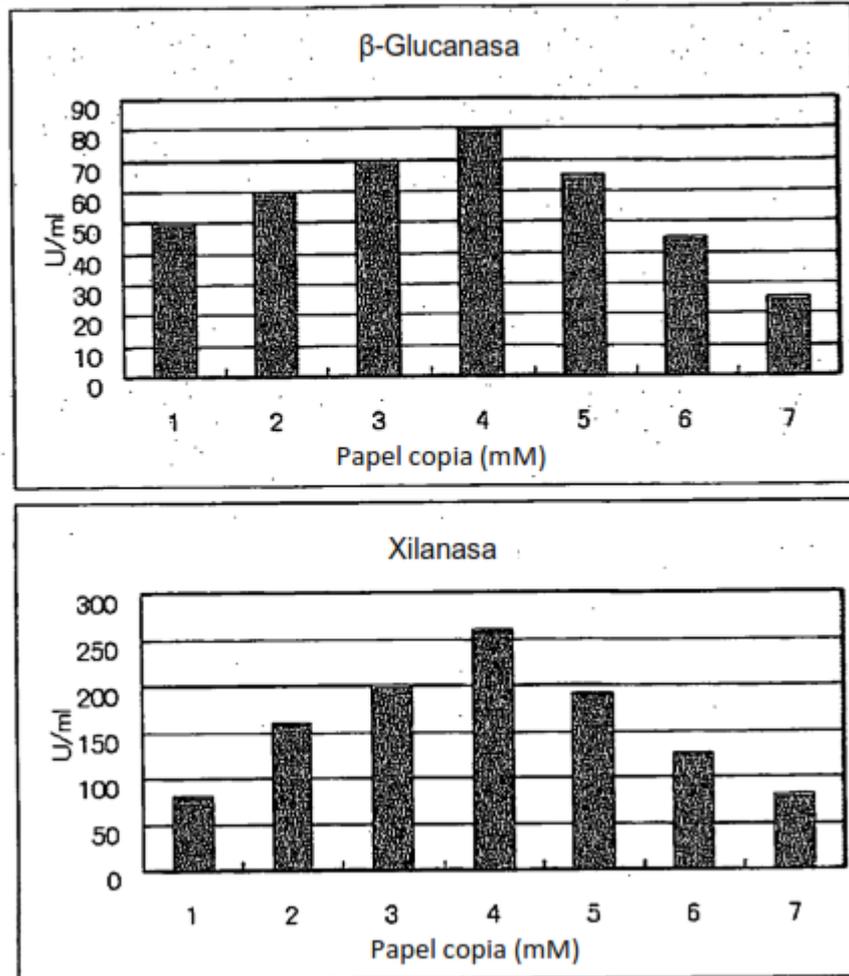
[Figura 7]



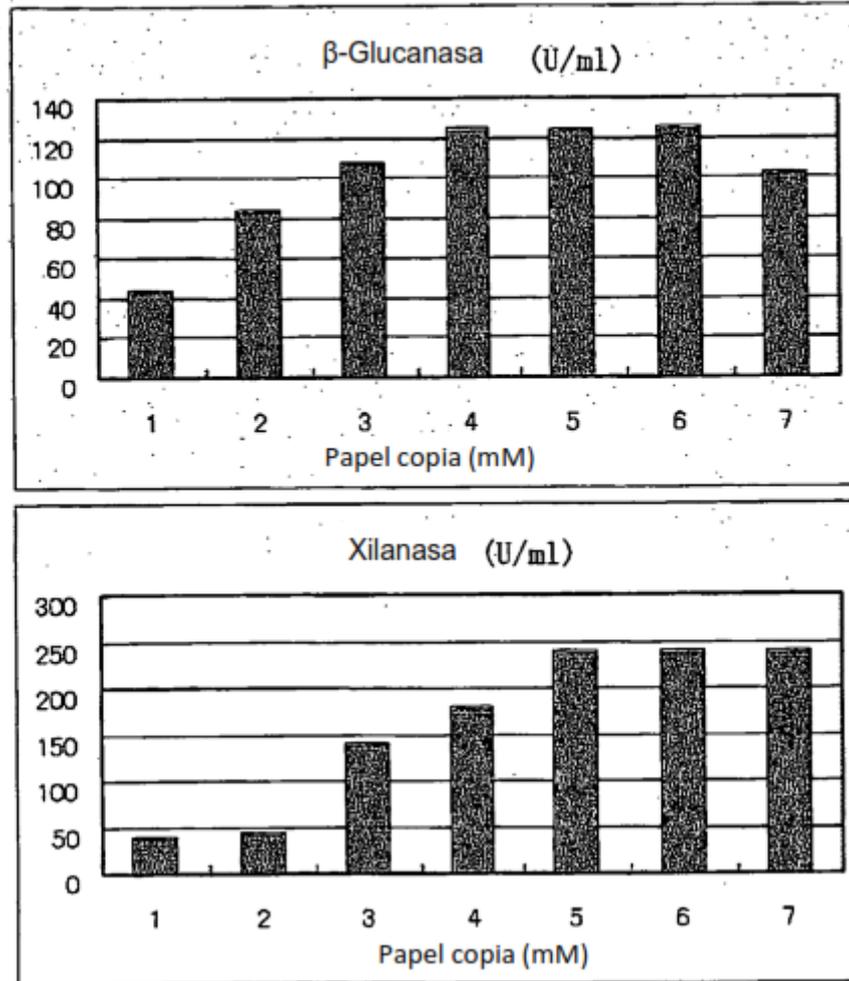
[Figura 8]



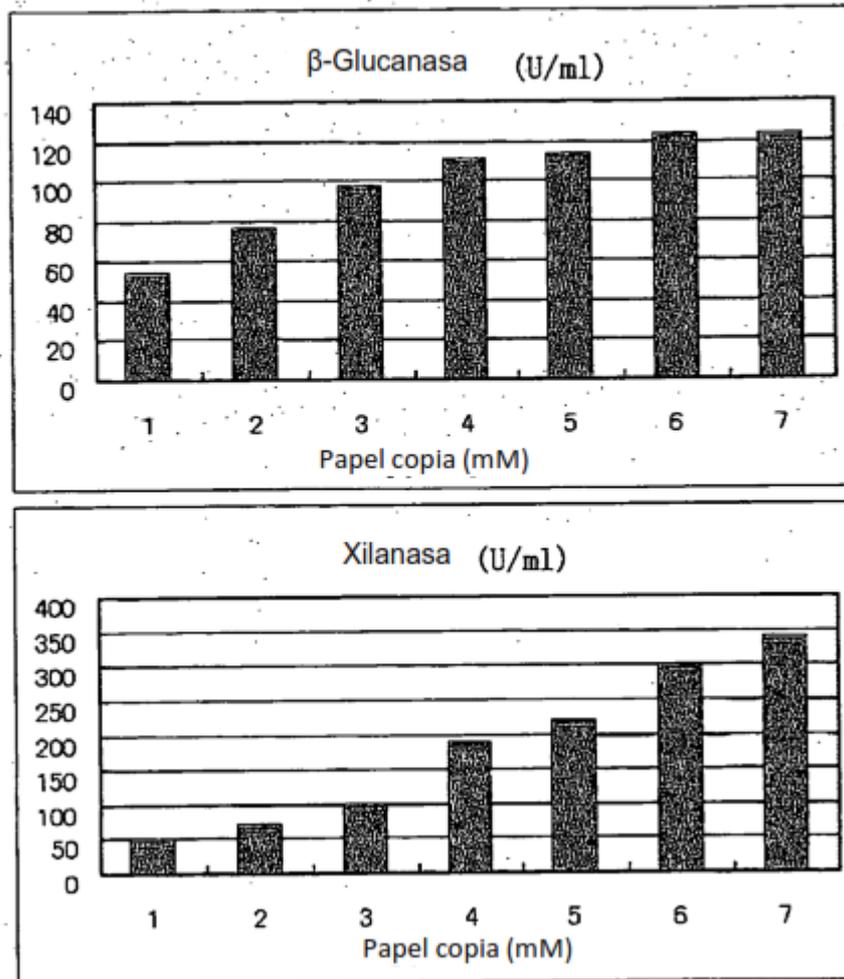
[Figura 9]



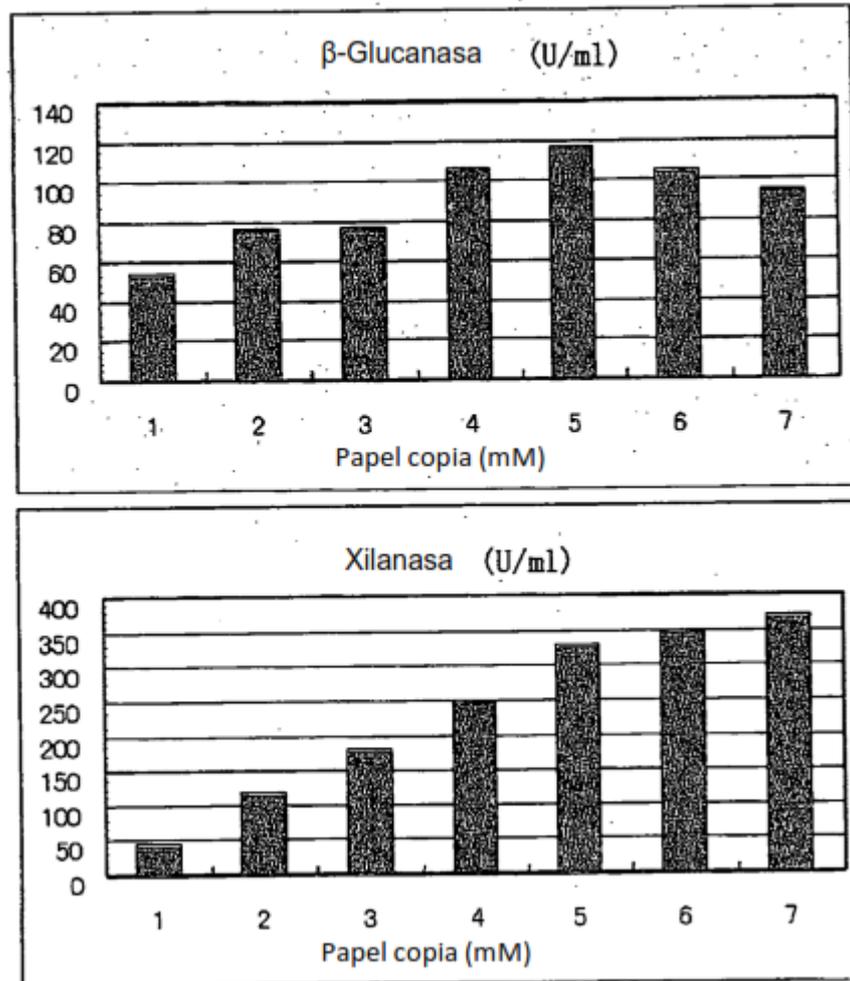
[Figura 10]



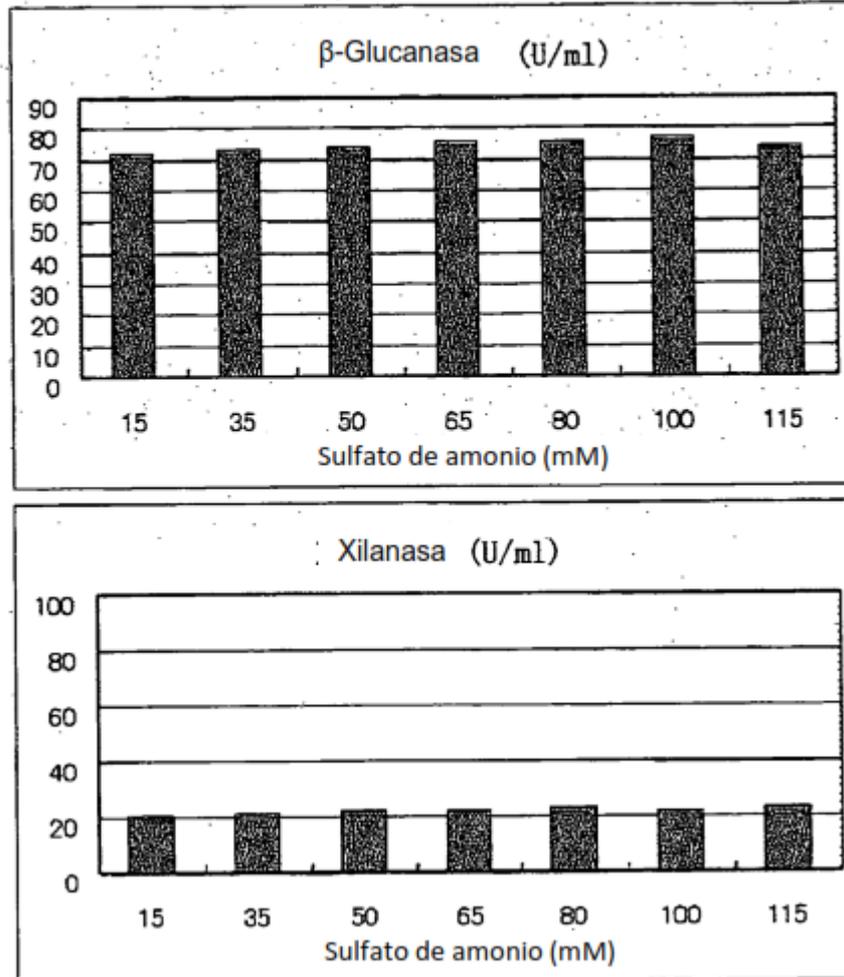
[Figura 11]



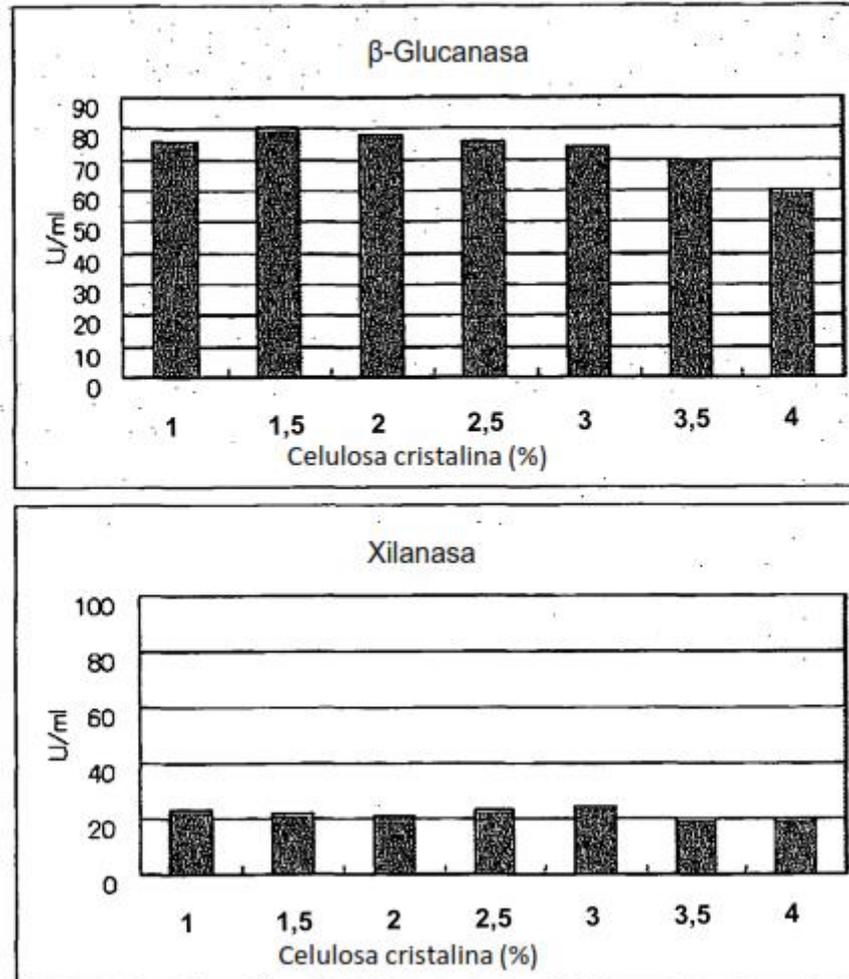
[Figura 12]



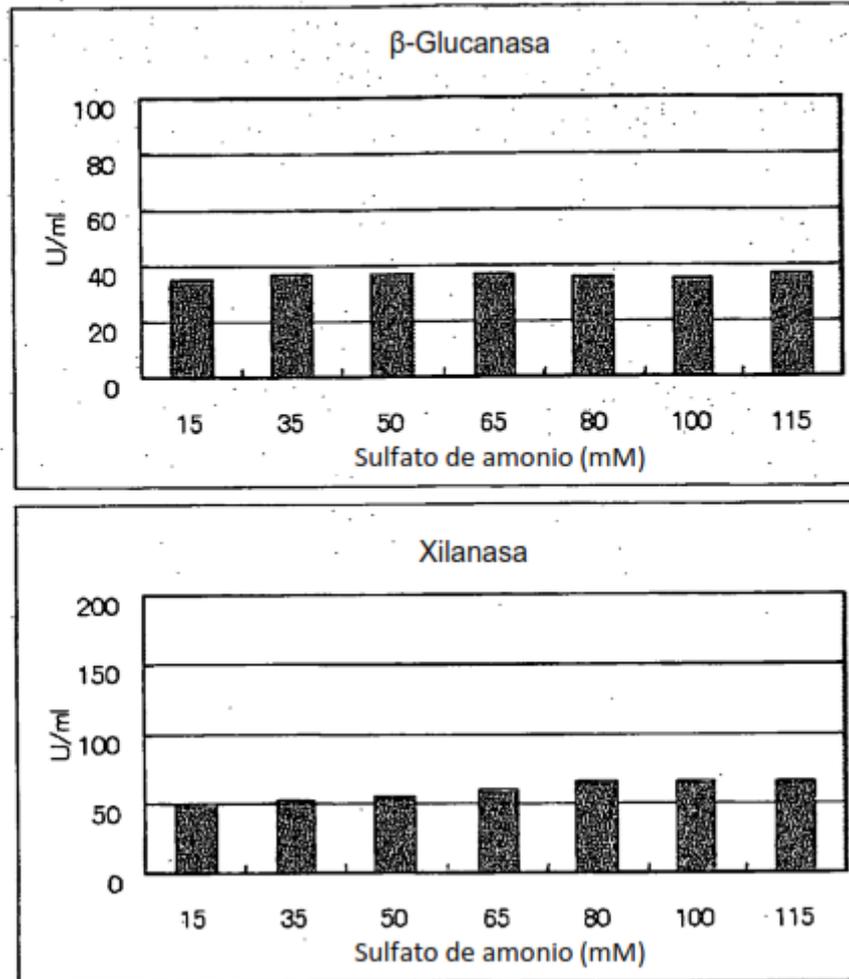
[Figura 13]



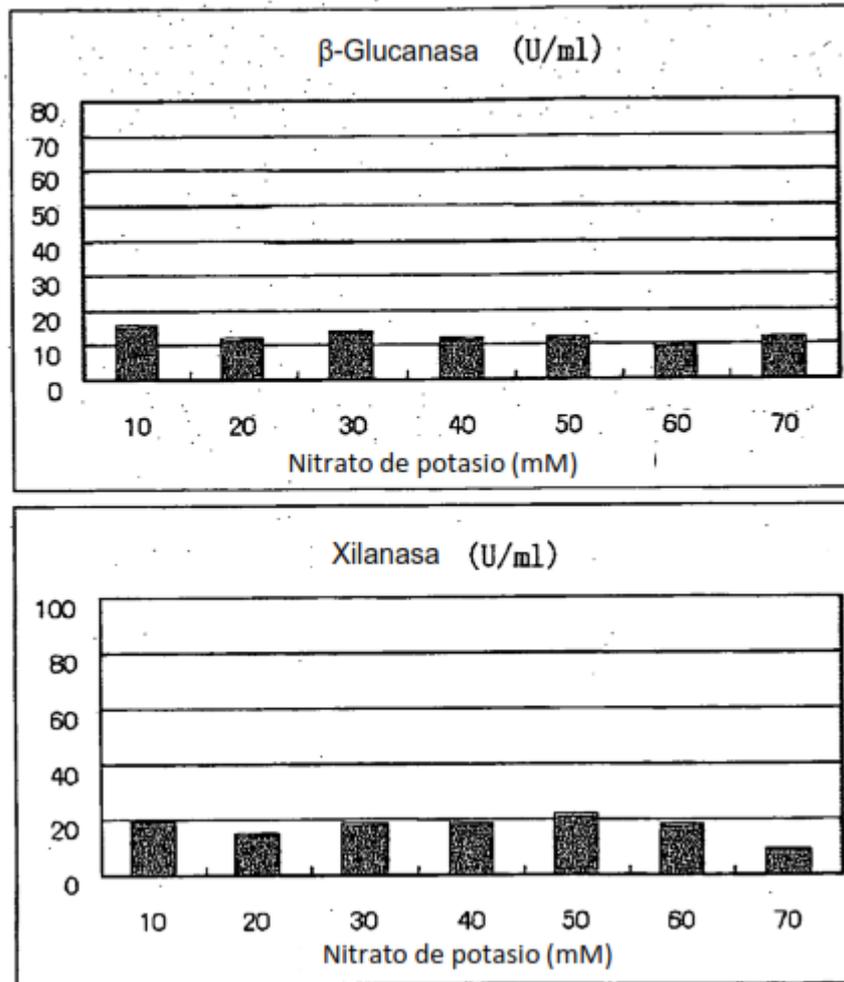
[Figura 14]



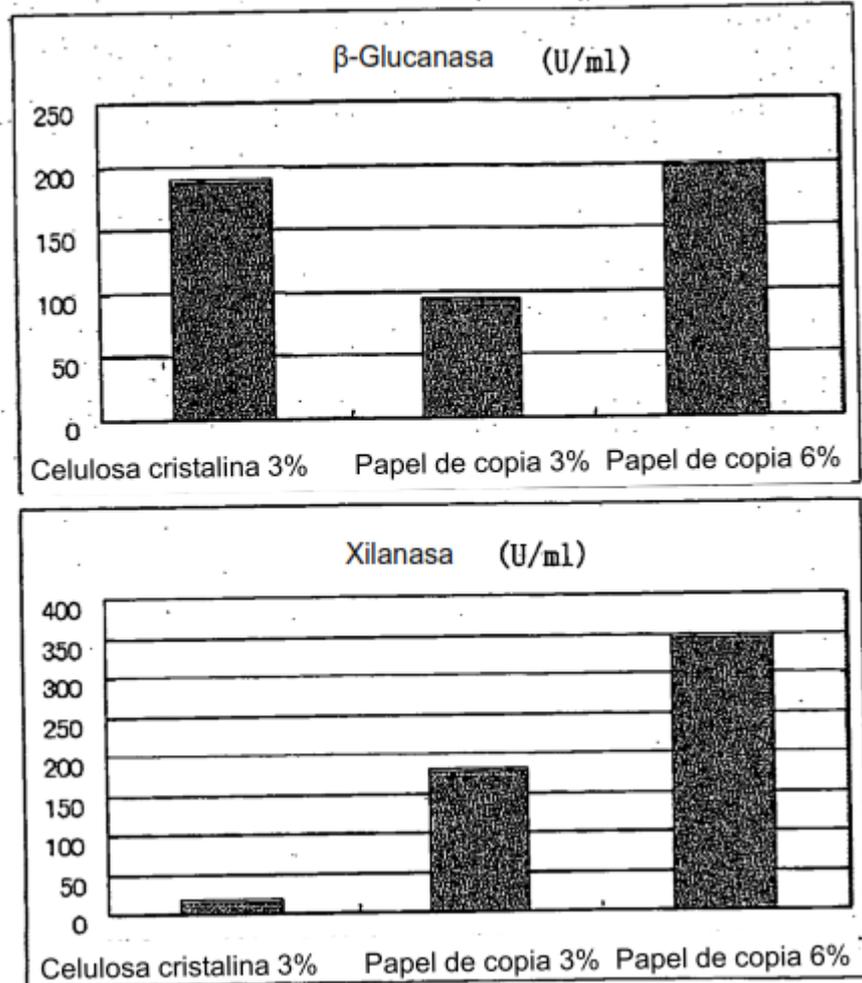
[Figura 15]



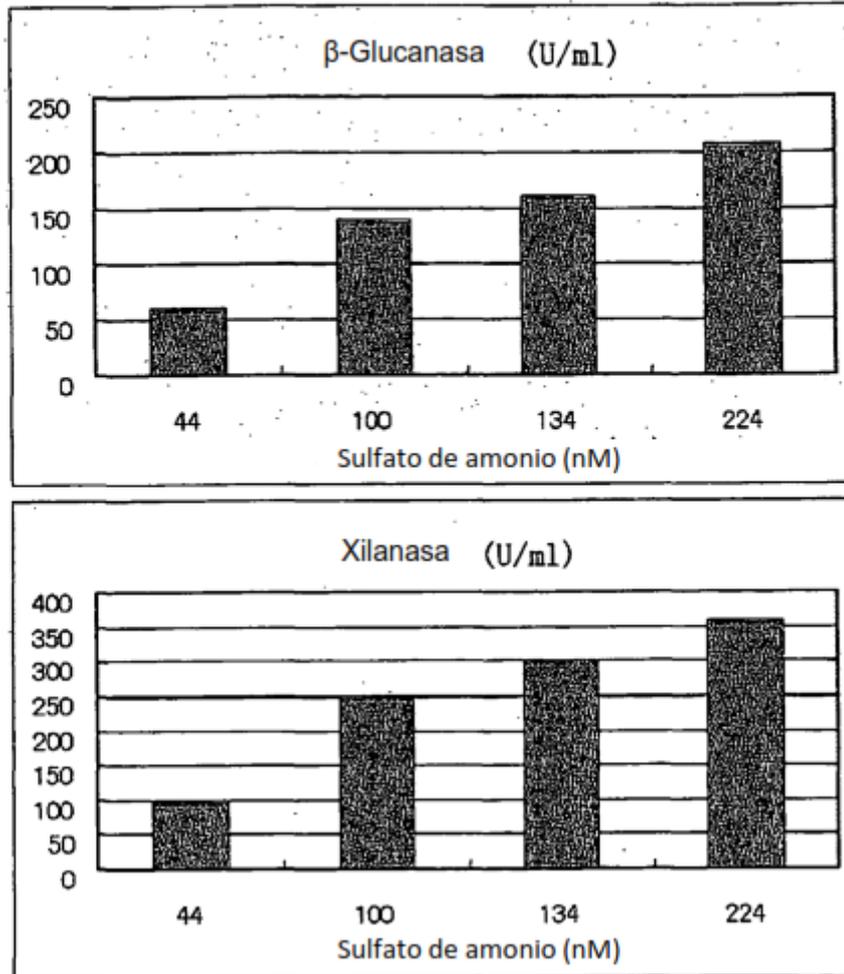
[Figura 16]



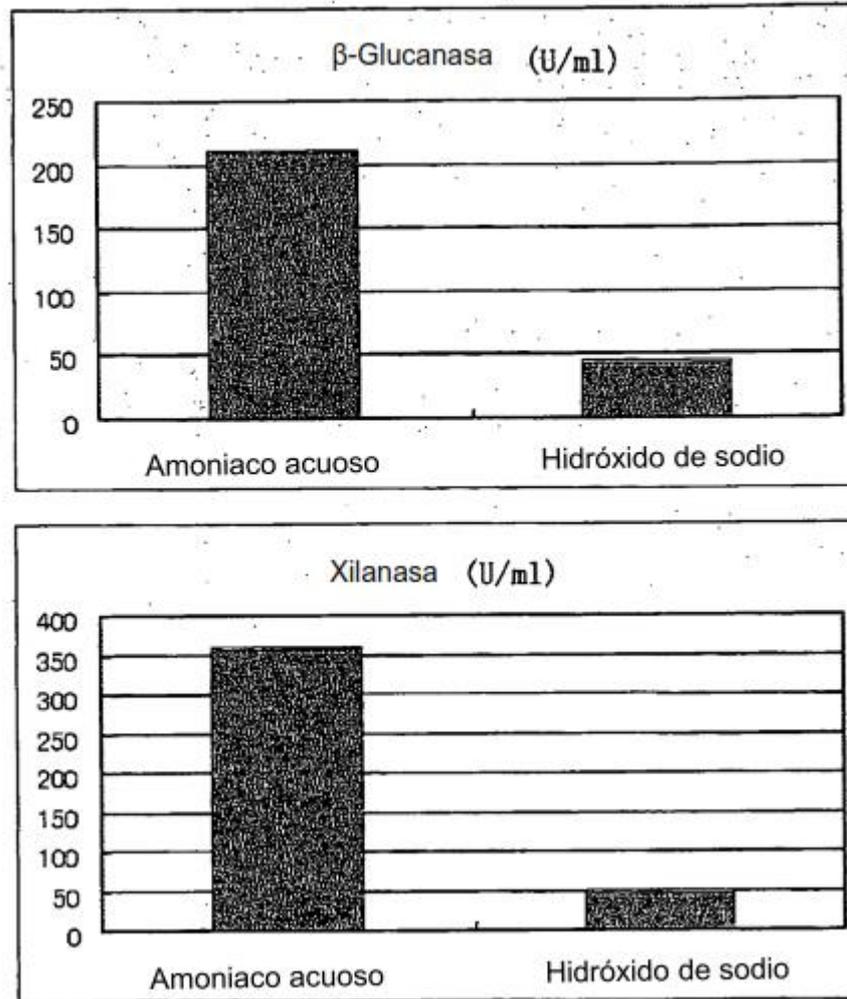
[Figura 17]



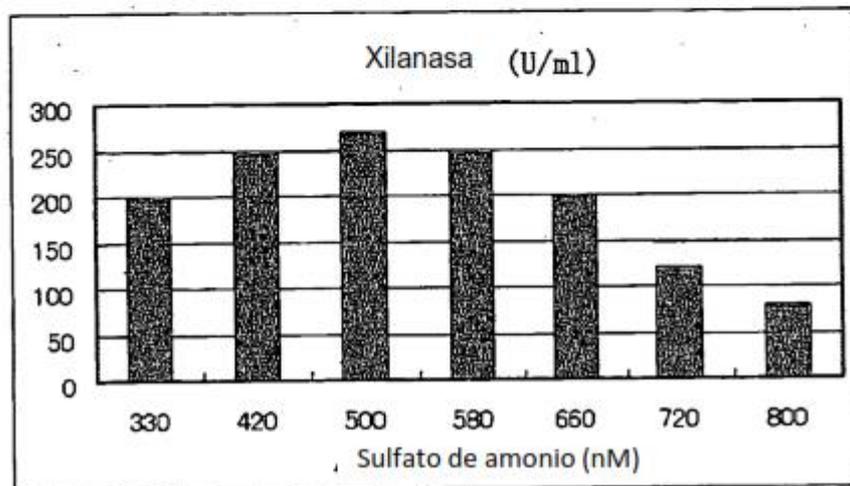
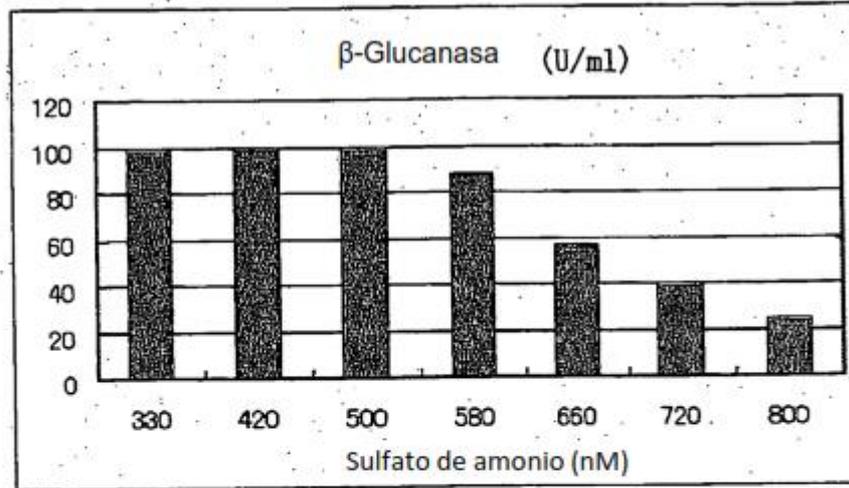
[Figura 18]



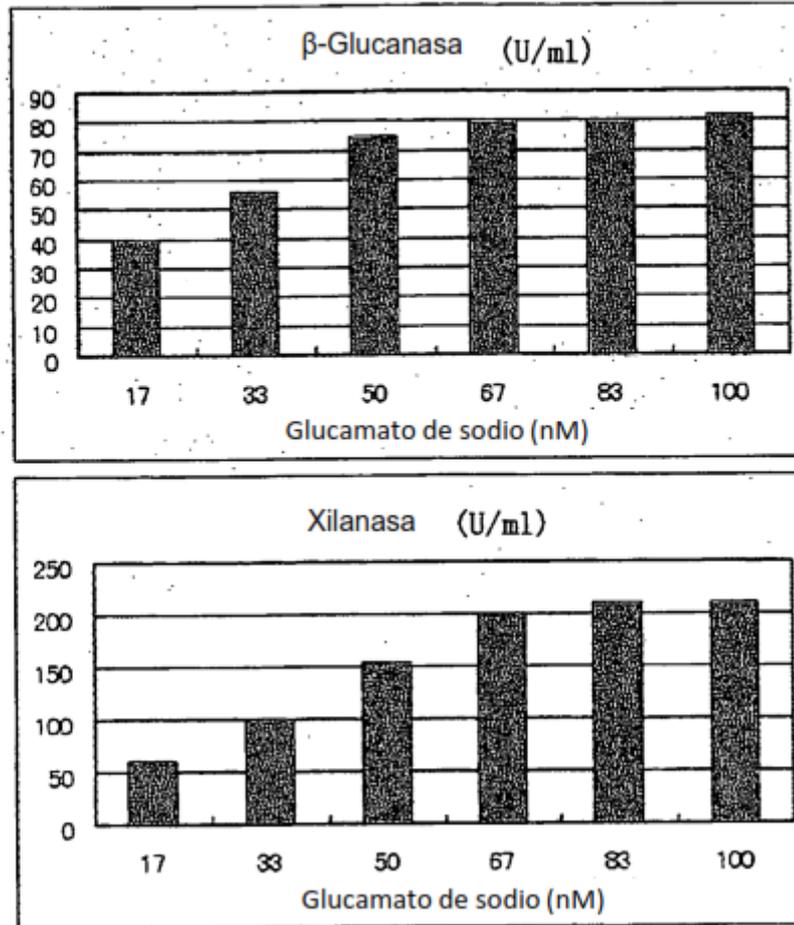
[Figura 19]



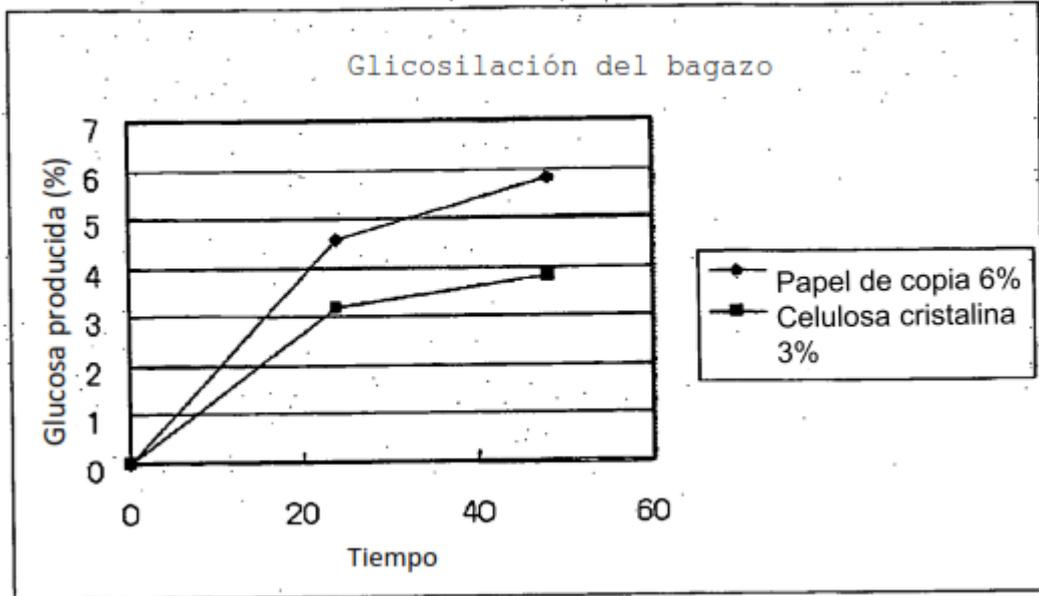
[Figura 20]



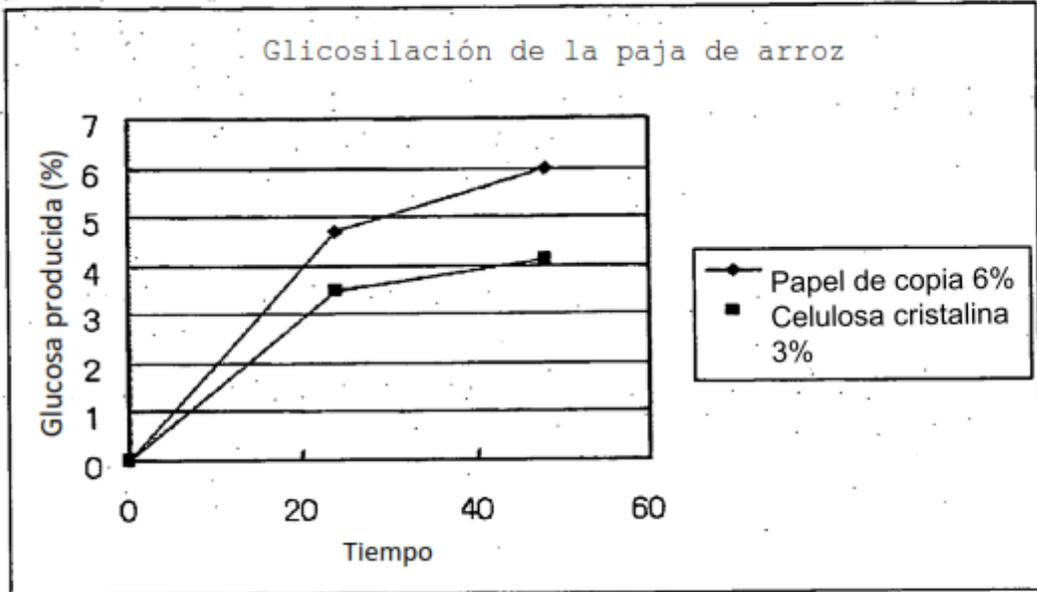
[Figura 21]



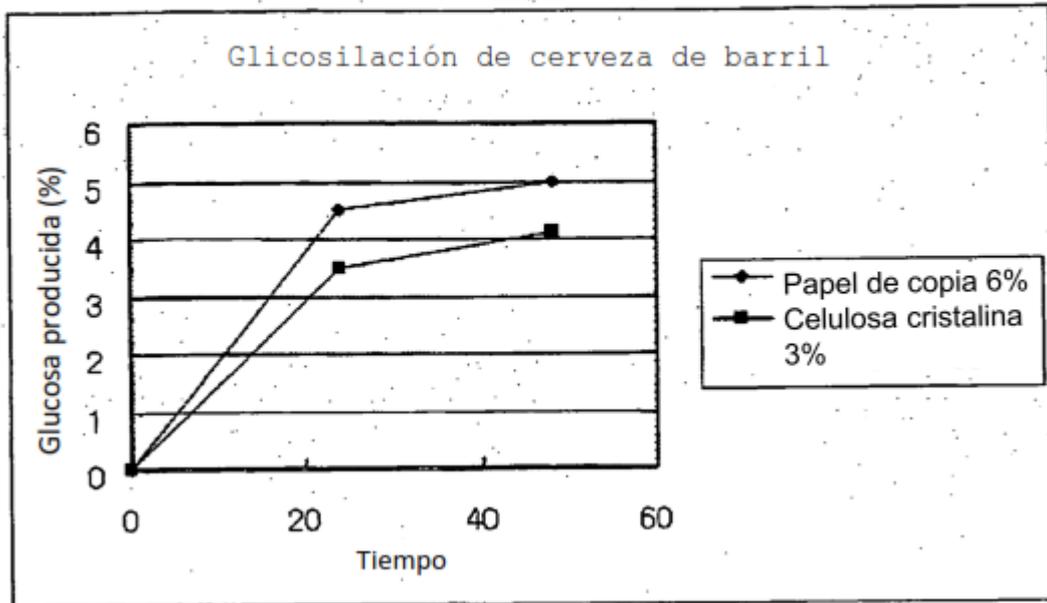
[Figura 22]



[Figura 23]



[Figura 24]



[Figura 25]

