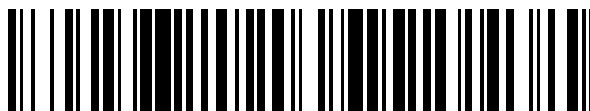


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 730**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/KR2013/001406**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO2013125886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13752441 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2829173**

54 Título: **Nueva cepa fúngica para la producción de celulosa y método de sacarificación que la utiliza**

30 Prioridad:
24.02.2012 KR 20120019335

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2017

73 Titular/es:
**SK CHEMICALS CO., LTD. (50.0%)
Sampyeong-dong, 310 Pangyo-ro Bundang-gu
Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-400, KR y
LEE, JUNG KUL (50.0%)**

72 Inventor/es:
**LEE, JUNG KUL;
KIM, TAE SU;
JAGTAP, SUJIT SADASHIV;
CHA, MIN HO;
LEE, JONG IN y
ROH, HANG DUK**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 618 730 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

Nueva cepa fúngica para la producción de celulasa y método de sacarificación que la utiliza

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la nueva cepa SKU714 de *Pholiota adiposa*, un método para producir celulasa a partir de la cepa y un método para sacarificar celulosa mediante el uso de la celulasa producida.

Antecedentes de la técnica

10 La celulosa es la materia orgánica más abundante en la Tierra. Es un recurso renovable que no corre riesgo de agotarse, a diferencia del petróleo o el carbón. Sin embargo, la celulosa se descarta en su mayoría como desechos forestales y agrícolas, que se consideran una de las mayores causas de contaminación ambiental. Cada año, se producen más de 3 mil millones de toneladas de desechos agrícolas y forestales a nivel mundial, y solamente en Asia se producen más de 800 millones de toneladas.

Dado que los desechos agrícolas y forestales están compuestos en su mayoría por celulosa y hemicelulosa, si se pueden convertir en monosacáridos, inclusive glucosa, a través de la sacarificación, podría ser de gran utilidad para resolver problemas concernientes con el medio ambiente, los combustibles y la alimentación.

15 Como método general de recuperación de monosacáridos a partir de desechos agrícolas y forestales, se conoce un método de añadir ácido sulfúrico y llevar a cabo la sacarificación a alta temperatura y presión. Sin embargo, este método es problemático dado que es necesario un equipo costoso que pueda resistir el ácido fuerte y la alta presión, la separación y recuperación de monosacáridos es difícil debido a la producción de diversos subproductos, el costo de la producción es elevado debido a la necesidad de desechar los subproductos y los procesos asociados no son ecológicos. Dado que el método de sacarificación general es limitado para su aplicación comercial, se han realizado investigaciones sobre un método de sacarificación de celulosa más ecológico para reemplazarlo. A este respecto, se han desarrollado y comercializado diversas enzimas de sacarificación para diversos sectores de la industria. Además, su aplicación se ha estudiado de manera activa. Como enzima de sacarificación, se utiliza ampliamente la celulasa en las industrias de la alimentación, detergente, fabricación de papel y textil. Además, se utiliza para producir alimentos bajos en calorías, desechos de alimentos fermentados o similares.

20 La pared celular de una planta consiste en polímeros, tales como celulosa (fibra de β -1,4-glucano insoluble), hemicelulosa (polisacárido no celulósico) y lignina (complejo de polisacárido y polifenol). Entre los componentes, la celulosa está presente en la mayor cantidad, seguida por la hemicelulosa con xilano como un constituyente principal. Los dos componentes constituyen más del 50% de la biomasa vegetal total. La celulosa es un homopolímero de unidades de glucosa unidas por un enlace β -1,4. Para descomponerla y producir monosacáridos, son necesarios tres tipos de enzimas, es decir, endo- β -1,4-glucanasa (endo- β -1,4-) [EC 3.2.1.4], exo- β -1,4-glucanasa [EC 3.2.1.91] y β -glucosidasa. La endo-glucanasa escinde los enlaces de β -1,4 glucosa de forma aleatoria desde dentro y la exo-glucanasa descompone por escisión un glucano para producir el disacárido celobiosa en un extremo no reductor. La celobiosa finalmente se descompone para producir glucosa mediante β -glucosidasa.

35 La celulasa se produce mayormente usando mohos (hongos). En particular, se produce de forma industrial mediante el uso de *Aspergillus* y *Trichoderma*. Aunque la cepa ZU-02 de *Trichoderma reesei* (*Trichoderma reesei* ATCC 56764) se ha estudiado ampliamente como una cepa productora de celulasa representativa, la actividad y concentración de la enzima no son suficientes como para satisfacer las necesidades industriales. Por ejemplo, aunque el proceso de producir etanol a partir de biomasa tiene muchas ventajas en términos de reciclado de recursos, el carácter ecológico del combustible producido, etc., la producción de etanol a partir de la sustancia lignocelulósica es muy costoso en comparación con la producción de gasolina. En el proceso de producción de etanol, el costo de la producción de enzima de sacarificación asciende aproximadamente al 60 % del costo total de producción.

40 Por consiguiente, existe una gran necesidad de un proceso de sacarificación de celulosa eficaz, particularmente uno que sea ecológico mediante el uso de una cepa nueva.

45 Descripción

Problema técnico

La presente invención ha sido realizada para resolver los problemas mencionados aquí anteriormente de la técnica anterior.

50 La presente invención se refiere a proporcionar una nueva cepa productora de celulasa novedosa que presenta una actividad elevada.

La presente invención también se refiere a proporcionar un método para producir celulasa mediante el uso de la cepa.

La presente invención también se refiere a proporcionar un método para la sacarificación de celulosa mediante el uso de celulasa.

Solución técnica

En un aspecto, la presente invención proporciona una cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* (n.º de acceso KCCM 11187P) productora de celulasa.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir celulasa, que incluye cultivar la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* (nº de acceso KCCM 11187P).

En el método de producción de celulasa según la presente invención, el cultivo se puede realizar mediante el uso de un medio con pH 4,5-5,5 que contenga polvo de maíz fermentado (5-10 g/L), extracto de levadura (1-5 g/L), dihidrógeno fosfato de potasio (3-7 g/L), hidrógeno fosfato de potasio (3-7 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado (1-5 g/L), hidrocloreuro de tiamina (0,01-0,03 g/L) y una fuente de carbono (10-30 g/L).

- 10 En el método de producción de celulasa según la presente invención, la fuente de carbono se puede seleccionar de un grupo que consiste en celulosa, celobiosa, paja de arroz y avicel.

En el método de producción de celulasa según la presente invención, el cultivo se puede realizar en condiciones de una velocidad de agitación de 100-200 rpm, una tasa de aireado de 0,8-1,2 vvm (vvm significa **volumen de gas por volumen de líquido por minuto**) y una temperatura de cultivo de 25-30°C.

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la sacarificación de celulosa mediante el uso de celulasa producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa*.

En el método de sacarificación de celulosa según la presente invención, la sacarificación se puede llevar a cabo en condiciones de una concentración de sustrato de 5-25% en peso, una concentración de celulosa de 1-45 FPU/g de sustrato, pH 4-7 y una temperatura de 50-80°C.

- 20 En el método de sacarificación de la celulosa según la presente invención, puede utilizarse álamo, paja de arroz o una mezcla de las mismas como sustrato o fuente de celulosa.

Efectos ventajosos

La nueva cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* según la presente invención, que se aísla de un hongo, produce celulasa con actividad elevada.

- 25 Dado que la celulasa producida por la nueva cepa según la presente invención presenta un rendimiento de sacarificación mejor que las enzimas de sacarificación existentes, puede utilizarse en diversas aplicaciones, inclusive producción de bioenergía, industria textil, industria de la fabricación de papel, industria de detergentes, industria de alimentos, producción de alimentos bajos en calorías, fermentación de desechos alimenticios y similares.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La Figura 1 muestra un resultado del análisis de la relación genética entre la secuencia de ADN_r de ITS-5.8S de la cepa de la presente invención y especies similares.

La Figura 2a muestra un resultado de medición de la actividad de β-glucosidasa (-•-), actividad de celobiohidrolasa (-o-), actividad de endoglucanasa (-▲-) y producción de glucosa (-Δ-) mediante degradación de papel de filtro por cantidad unitaria de enzima de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* en función del tiempo de cultivo.

- 35 La Figura 2b muestra los resultados de la medición de actividad de xilanasas (-•-), actividad de lacasa (-o-), actividad de mananasa (-▲-) y actividad de lignina peroxidasa (-Δ-) de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* en función del tiempo de cultivo.

La Figura 3a muestra la actividad de β-glucosidasa producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* en función del pH.

- 40 La Figura 3b muestra la actividad de β-glucosidasa producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* en función de la temperatura.

Mejor forma de poner en práctica la invención

La presente invención se describirá en mayor detalle a través de los ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado por los ejemplos.

- 45 Ejemplo 1. Cribado de cepa productora de celulasa

Para el cribado de cepas productoras de celulasa, se suspendieron 10 μL de una suspensión de hongos en 10 mL de solución salina fisiológica. 10 μL de la solución resultante (1x10⁴ ufc mL⁻¹) se colocaron en placas en agar de dextrosa y patata que contenía carboximetilcelulosa al 2% y se incubaron a 27°C durante 3 días. Después de formarse la colonia sobre el medio de agar sólido, la placa se tiñó con rojo Congo al 0,1% y después se destiñó con cloruro de

sodio 1 M. Entonces, se cribaron las cepas de hongo productoras de celulasa mediante selección de las que tenían aureolas producidas por la hidrólisis de la celulosa alrededor de la colonia.

- 5 Las cepas principales (S1-S6) se cribaron a través de este procedimiento. De las cepas cribadas, la cepa S4 que presentó la mejor capacidad de degradar la celulosa se seleccionó después de evaluarla sobre el medio de agar sólido que contenía carboximetilcelulosa usando la cepa ZU-02 de *Trichoderma reesei* productora existente como control (C).

Ejemplo 2. Identificación de la cepa

Para identificar la cepa S4 cribada en el Ejemplo 1, la secuencia de ADN de ITS-5.8S fue analizada por el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos. La secuencia de ADN de ITS-5.8S de la cepa S4 se denominó SEQ ID NO 1.

- 10 Como resultado del análisis de la relación genética entre las secuencias de ADN de ITS-5.8S de la cepa S4 con especies similares, la cepa de S4 se identificó como *Pholiota adiposa* (Figura 1).

La cepa S4 se denominó "*Pholiota adiposa* SKU714" y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos el 20 de abril de 2011, con el n.º de acceso KCCM 11187P según el Tratado de Budapest.

Ejemplo 3. Optimización del medio para producir celulasa

- 15 (1) Actividad de celulasa en función de la fuente de carbono

La actividad de producción de celulasa de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* en función de la fuente de carbono se evaluó en un tanque de fermentación de 7 L. Se usaron celulosa, glucosa, lactosa, maltosa, celobiosa, carboximetilcelulosa, sacarosa, xilano, paja de arroz y avicel como fuentes de carbono.

- 20 Después de inocular la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* en un matraz de 50 mL que contenía 50 mL de un medio de cultivo completo (4 g/L de almidón de patata, 20 g/L de dextrosa), la cepa se cultivó en una incubadora con agitación a 150 rpm y 25°C durante 5 días. 50 mL del cultivo se inocularon en un matraz de 50 mL que contenía medio de crecimiento (8 g/L de polvo de maíz fermentado, 2 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de dihidrógeno fosfato de potasio, 5 g/L de hidrógeno fosfato de potasio, 3 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,02 g/L de hidrocloreuro de tiamina y 20 g/L de fuente de carbono, pH 5) y se cultivaron a 150 rpm, 25°C y pH 5 durante 7 días.

- 25 El resultado de la medición de la actividad de β -glucosidasa y la producción de glucosa de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* para cada fuente de carbono se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Fuente de carbono (20 g/L)	Actividad de β -glucosidasa (U/ mL)	Producción de glucosa a través de la degradación de papel de filtro por cantidad unitaria de enzima (U/ml)
Celulosa	16,4	0,63
Glucosa	3,45	0,15
Lactosa	4,10	0,14
Maltosa	8,60	0,31
Celobiosa	10,6	0,43
Carboximetilcelulosa	3,52	0,13
Sacarosa	3,42	0,12
Xilano	5,30	0,26
Paja de arroz	15,0	0,52
Avicel	14,9	0,61

- 30 Tal como se observa a partir de la Tabla 1, se logró una actividad superior de celulasa cuando se utilizó celulosa, celobiosa, paja de arroz y avicel como fuente de carbono. La actividad máxima de celulasa se logró cuando se utilizó celulosa como fuente de carbono.

(2) Actividad de celulasa en función de la fuente de nitrógeno

La actividad de producción de celulasa de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* en función de la fuente de nitrógeno se evaluó en un tanque de fermentación de 7 L. Se utilizaron extracto de levadura, peptona, polvo de maíz fermentado, urea, sulfato de amonio, nitrato de potasio, nitrato de sodio y triptona como fuente de nitrógeno.

- 5 Un resultado de la medición de actividad de β -glucosidasa y la producción de glucosa de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* para cada fuente de carbono a una concentración de 5 g/L se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Fuente de nitrógeno (5 g/L)	Actividad de β -glucosidasa (U/ mL)	Producción de glucosa a través de la degradación de papel de filtro por cantidad unitaria de enzima (U/ml)
Extracto de levadura	18,6	0,72
Peptona	11,8	0,45
Polvo de maíz fermentado	18,5	0,70
Urea	14,5	0,31
Sulfato de amonio	6,0	0,24
Nitrato de potasio	11,1	0,36
Nitrato de sodio	10,7	0,34
Triptona	14,6	0,69

- 10 Tal como se observa a partir de la Tabla 2, se logró una actividad superior de celulasa cuando se utilizó extracto de levadura, polvo de maíz fermentado y triptona como fuente de nitrógeno. La actividad máxima de celulasa se logró cuando se utilizó extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Ejemplo 4. Optimización de la condición de cultivo para la producción de enzima de actividad elevada

(1) Optimización de la condición de cultivo cuando se utiliza álamo como sustrato

- 15 La condición de cultivo se optimizó en un tanque de fermentación de 7 L mediante el uso de un medio que contenía polvo de maíz fermentado (8 g/L), extracto de levadura (2 g/L), dihidrógeno fosfato de potasio (5 g/L), hidrógeno fosfato de potasio (5 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado (3 g/L), hidrocloreuro de tiamina (0,02 g/L) y álamo (20 g/L). Se comparó la actividad de celulasa mientras se variaba el pH de 3 a 7 y se cambiaba la temperatura de cultivo de 20 a 35°C. La actividad máxima de celulasa se obtuvo con pH 5 y 25-30°C.

- 20 Además, la actividad de cada celulasa con tiempo de cultivo se midió con la condición optimizada de cultivo (pH 5, 25°C) en el medio que contenía el sustrato de álamo (Figuras 2a y 2b). La Figura 2a muestra un resultado de la medición de las actividades de β -glucosidasa, celobiohidrolasa y endoglucanasa y producción de glucosa a través de la degradación de papel de filtro por cantidad unitaria de enzima con tiempo de cultivo. La Figura 2b muestra un resultado de la medición del cambio en las actividades de xilanasas, lacasa, mananasa y lignina peroxidasa con tiempo de cultivo.

25 (2) Optimización de producción y actividad de celulasa cuando se utiliza paja de arroz como sustrato

- 30 La condición de cultivo se optimizó en un tanque de fermentación de 7 L mediante el uso de un medio que contenía polvo de maíz fermentado (8 g/L), extracto de levadura (2 g/L), dihidrógeno fosfato de potasio (5 g/L), hidrógeno fosfato de potasio (5 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado (3 g/L), hidrocloreuro de tiamina (0,02 g/L) y paja de arroz (20 g/L). La producción de celulasa se comparó mientras se variaba el pH de 3 a 7 y se cambiaba la temperatura de cultivo de 20 a 35°C. La producción máxima de celulasa se obtuvo con pH 5 y 25-30°C.

Además, se comparó la actividad de β -1,4-glucosidasa mientras se variaba el pH de 3 a 7,5 y se cambiaba la temperatura de 40 a 85°C. El resultado se muestra en las Figuras 3a y 3b. Tal como se observa en las Figuras 3a y 3b, la actividad máxima de celulasa se obtuvo con pH 5 y 65°C.

Ejemplo 5. Análisis del rendimiento de sacarificación

- 35 En general, la lignocelulosa contenida en una planta no puede sacarificarse con alto rendimiento únicamente con hidrólisis enzimática. Por este motivo, la lignina y hemicelulosa se fragmentan antes de la hidrólisis enzimática por medio de un proceso de pretratamiento para aumentar la eficiencia de la hidrólisis de celulosa mediante celulasa. En el

Ejemplo 5, para el pretratamiento, se agregaron 10 g de paja de arroz a un matraz que contenía 40 mL de sodio de hidróxido de sodio al 2% en peso y se hizo reaccionar a 85°C durante 1 hora. Entonces, se filtró la paja de arroz a través de un filtro de 0,45 µm y se secó a 65°C.

5 Para hallar la condición de sacarificación optimizada, se llevó a cabo el experimento mientras se variaba la concentración de enzima, la concentración del sustrato, la temperatura de reacción y el pH de la reacción.

10 Primero, la paja de arroz pretratada en diversas concentraciones se agregó a 20 mL de tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) junto con celulasa en diversas concentraciones. Después de la reacción a 15-55°C y 150 rpm durante 72 horas, la mezcla de reacción se hirvió a 100°C durante 3 minutos para separar la enzima desnaturalizada, la cual entonces se enfrió hasta temperatura ambiente y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos. La actividad de la enzima se midió mediante el método de azúcar reductor del sobrenadante.

El rendimiento de sacarificación se determinó según la Ecuación 1, midiendo la disminución de peso de la paja de arroz después del secado a 105°C durante 24 horas por gramo de paja de arroz.

Ecuación 1

15 Rendimiento de sacarificación (%) = [(peso de azúcar reductor producido/g de sustrato) x 0,9/Peso de carbohidratos en paja de arroz] x 100

(1) Rendimiento de sacarificación en función de la concentración de enzima

Se llevó a cabo la sacarificación mediante el uso de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* a 65°C y pH 6 mientras se variaba la concentración de enzima. Se muestra el resultado en la Tabla 3.

Tabla 3

Concentración de enzima (FPU/g de sustrato)	Rendimiento de sacarificación (%)
1	9,7
5	23,9
17,5	83,0
30	81,2
42,5	80,6

20 Tal como se observa a partir de la Tabla 3, el mejor rendimiento de sacarificación se obtuvo cuando la concentración de la enzima era 15-45 FPU/g de sustrato.

(2) Rendimiento de sacarificación en función de la concentración de sustrato

25 Se investigó el efecto de la concentración de sustrato sobre la sacarificación de álamo mediante la enzima de sacarificación producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa*. El rendimiento de sacarificación se midió mientras se variaba la concentración de sustrato de álamo de 1 a 27% en peso. Se muestra el resultado en la Tabla 4.

Tabla 4

Concentración de sustrato (% en peso)	Rendimiento de sacarificación (%)
1	43,0
2	63,5
11	81,2
20	83,1
27	51,0

30 Tal como se observa a partir de la Tabla 4, se obtuvo un rendimiento de sacarificación superior cuando la concentración inicial del sustrato de álamo era de 10-25% en peso. El mejor rendimiento de sacarificación se obtuvo cuando la concentración de álamo era de 20% en peso.

(3) Rendimiento de sacarificación en función de la temperatura

Se investigó el efecto de la temperatura sobre la sacarificación de álamo mediante la enzima de sacarificación producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa*. Se midió el rendimiento de sacarificación a diferentes temperaturas de reacción de 20, 35, 50, 65 y 80°C. Se muestra el resultado en la Tabla 5.

5 Tabla 5

Temperatura de reacción (°C)	Rendimiento de sacarificación (%)
20	33,2
35	45,0
50	75,8
65	82,1
80	71,2

Tal como se observa a partir de la Tabla 5, se obtuvo un rendimiento de sacarificación superior cuando la temperatura era de 50-80°C. El mejor rendimiento de sacarificación se obtuvo a 65°C.

(4) Rendimiento de sacarificación en función del pH

- 10 Se investigó el efecto del pH sobre la sacarificación de álamo mediante la enzima de sacarificación producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa*. Se midió el rendimiento de sacarificación a diferentes pH de reacción de 1, 3, 5, 7 y 9. Se muestra el resultado en la Tabla 6.

Tabla 6

pH	Rendimiento de sacarificación (%)
1	20,0
3	62,6
5	81,4
7	84,0
9	39,4

- 15 Tal como se observa a partir de la Tabla 6, se obtuvo un rendimiento de sacarificación superior con pH 4-7. El mejor rendimiento de sacarificación se obtuvo con pH 7.

Ejemplo 6. Sacarificación en condiciones optimizadas

(1) Sacarificación de álamo mediante el uso de celulasa de *Pholiota adiposa*

- 20 Se llevó a cabo la sacarificación de álamo en condiciones optimizadas mediante el uso de celulasa producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa*. La sacarificación se llevó a cabo en condiciones de una concentración de sustrato de 10% en peso, concentración de enzima de 25 FPU/g de sustrato, pH 6 y temperatura de 65°C. El rendimiento de sacarificación de la celulasa producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* se comparó con el de la celulasa de Novozymes derivada de *Trichoderma reesei* (1,5 L de Celluclast) en la Tabla 7.

Tabla 7

Celulasa	Producción de azúcar (mg/g de álamo)	Rendimiento de sacarificación (%)
SKU714 de <i>Pholiota adiposa</i>	672	84
1,5 L de Celluclast	242	35

25

(2) Sacarificación de paja de arroz mediante el uso de celulasa de *Pholiota adiposa*

5 Se llevó a cabo la sacarificación de paja de arroz en condiciones optimizadas mediante el uso de celulasa producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa*. La sacarificación se llevó a cabo durante 24 horas en condiciones de una concentración de sustrato de 10% en peso, concentración de enzima de 16 FPU/g de sustrato, pH 6 y temperatura de 65°C. El rendimiento de sacarificación de la celulasa producida por la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* se comparó con el de la celulasa de Novozymes derivada de *Trichoderma reesei* (1,5 L de Celluclast) y celulasa derivada de la cepa KTCC26163 de *Pholiota nameko* en la Tabla 8.

Tabla 8

Celulasa	Producción de azúcar (mg/g de paja de arroz)	Rendimiento de sacarificación (%)
SKU714 de <i>Pholiota adiposa</i>	690	88
<i>Trichoderma reesei</i>	582	76
<i>Pholiota nameko</i>	420	56

10 Aunque las cepas de *Pholiota nameko* y *Pholiota adiposa* pertenecen al mismo género de *Pholiota*, presentan efectos de sacarificación de celulosa bastante diferentes. Mientras que el uso de la cepa de *Pholiota nameko* como enzima de sacarificación está limitado debido a la baja productividad de proteína y baja actividad enzimática, la cepa de *Pholiota adiposa* según la presente invención es adecuada para la aplicación comercial debido a la producción de diversas enzimas degradantes de biomasa, inclusive celulasa, productividad elevada de proteína, actividad enzimática elevada
15 y buena estabilidad térmica.

N.º de acceso

Agencia del depósito: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos

N.º de acceso: KCCM 11187P

Fecha de acceso: 20110420

20 TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

Recibo en caso de un original emitido de conformidad con el Reglamento 7.1

Depositante: Jung Kul Lee

25 Dirección: Departamento de Ingeniería Química Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seúl 143-701, República de Corea

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: Pholiota adiposa	número de acceso otorgado por el AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: KCCM11187P
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado anteriormente en I fue acompañado por:	
<input type="checkbox"/> una descripción científica <input type="checkbox"/> una designación taxonómica propuesta (Marcar con una cruz lo que corresponda)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	

La presente Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado anteriormente en I, el cual fue recibido el 20 de abril de 2011.	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-l-dong, Seodaemun-gu SEÚL 120-091 República de Corea	Firma/s de la/s persona/s autorizada/s a representar a la Autoridad Depositaria Internacional o del/de los funcionario/s autorizado/s Fecha: 20 de abril de 2011.

Formulario BP/4 (KCTC Formulario17)

Texto Libre

- 5 <110> SK CHEMICALS CO., LTD.
- <120> Nueva cepa que produce celulasa y método de sacarificación que la utiliza
- <130< DP-2011-0069
- 10 <161> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- 15 <211> 592
- <212> ADN
- <213> Pholiota adiposa
- <400> 1
- 20

aaggatcatt attgaatgaa cttggtatga ttgttctgg cccatctggg catgtgcacg 60
tetgceatct ttatctctcc acctgtgcac afattgtagg tctggaataa atttctgagg 120
caactcagta gtggggaatg ctgctgcaaa geggctttgc ctgtaattc agatctatgt 180
ttcatatac accataaaaa tgtaacagaa tgtaataatg ggtcttctac ctataaacta 240
tatacaactt tcagcaacgg atctcttggc tctcgcatcg atgaagaacg cagcgaaatg 300
cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac gcaccttgcg 360
ctccttgga ttccgaggag catgcctgtt tgagtgtcat taaattctca atcttattag 420
cttttgtaa taaagacttg gatgtggggg ggaaatfttt ttgaaggftt ctgcgagacc 480
ttctccccta aatgcatta gctggctgct cgcgcgaact gtctattggt gtgataatta 540
tctacgceat tgactaactg ccatagtagc accgcttcta atcgtctctg ga 592

<110> SK CHEMICALS CO., LTD.

5 <120> Nueva cepa que produce celulasa y método de sacarificación que la utiliza

<130> DP-2011-0069

<160> 1

10 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 592

15 <212> ADN

<213> Pholiota adiposa

<400> 1

ES 2 618 730 T3

aaggatcatt attgaatgaa cttggtatga ttggtgctgg cccatctggg catgtgcacg	60
tctgccatct ttatctctcc acctgtgcac atattgtagg tctggaataa atttctgagg	120
caactcagta gtggggaatg ctgctgcaaa gcggctttgc ctgtaatttc agatctatgt	180
tttcatatac accataaaaa tgtaacagaa tgtaataatg ggtcttgtag ctataaacta	240
tatacaactt tcagcaacgg atctcttggc tctcgcatcg atgaagaacg cagcgaaatg	300
cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac gcaccttgcg	360
ctccttggtg ttccgaggag catgcctggt tgagtgtcat taaattctca atcttattag	420
cttttgtaa taaagacttg gatgtggggg ggaaatTTTT ttgaaggttt ctcgagagcc	480
ttctccccta aaatgcatta gctggtcgct cgcgcgaact gtctattggt gtgataatta	540
tctacgccat tgactaactg ccatagtagc accgcttcta atcgtcttcg ga	592

REIVINDICACIONES

1. Una cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* productora de celulasa depositada con el n.º de acceso KCCM 11187P.
2. Un método para producir celulasa, que comprende producir celulasa mediante el cultivo de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* según la reivindicación 1.
- 5 3. El método de producción de celulasa según la reivindicación 2, en donde el cultivo se realiza en un medio con pH 4,5-5,5 que contiene polvo de maíz fermentado (5-10 g/L), extracto de levadura (1-5 g/L), dihidrógeno fosfato de potasio (3-7 g/L), hidrógeno fosfato de potasio (3-7 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado (1-5 g/L), hidrocloreuro de tiamina (0,01-0,03 g/L) y una fuente de carbono (10-30 g/L).
- 10 4. El método de producción de celulasa según la reivindicación 3, en donde la fuente de carbono se selecciona de un grupo que consiste en celulosa, celobiosa, paja de arroz y avicel.
5. El método de producción de celulasa según la reivindicación 2 o 3, en donde el cultivo se realiza en condiciones de una velocidad de agitación de 100-200 rpm, una tasa de aireado de 0,8-1,2 vvm y una temperatura de cultivo de 25-30°C.
- 15 6. Un método para la sacarificación de celulosa, que comprende la sacarificación de un sustrato de celulosa mediante el uso de celulasa producida por el cultivo de la cepa SKU714 de *Pholiota adiposa* según la reivindicación 1.
7. El método de sacarificación de celulosa según la reivindicación 6, en donde el sustrato de celulosa es álamo, paja de arroz o mezclas de los mismos.
- 20 8. El método de sacarificación de celulosa según la reivindicación 6, donde la sacarificación se lleva a cabo en condiciones de una concentración de sustrato de 5-25% en peso, una concentración de celulosa de 1-45 FPU/g de sustrato, pH 4-7 y una temperatura de 50-80°C.

Figura 1

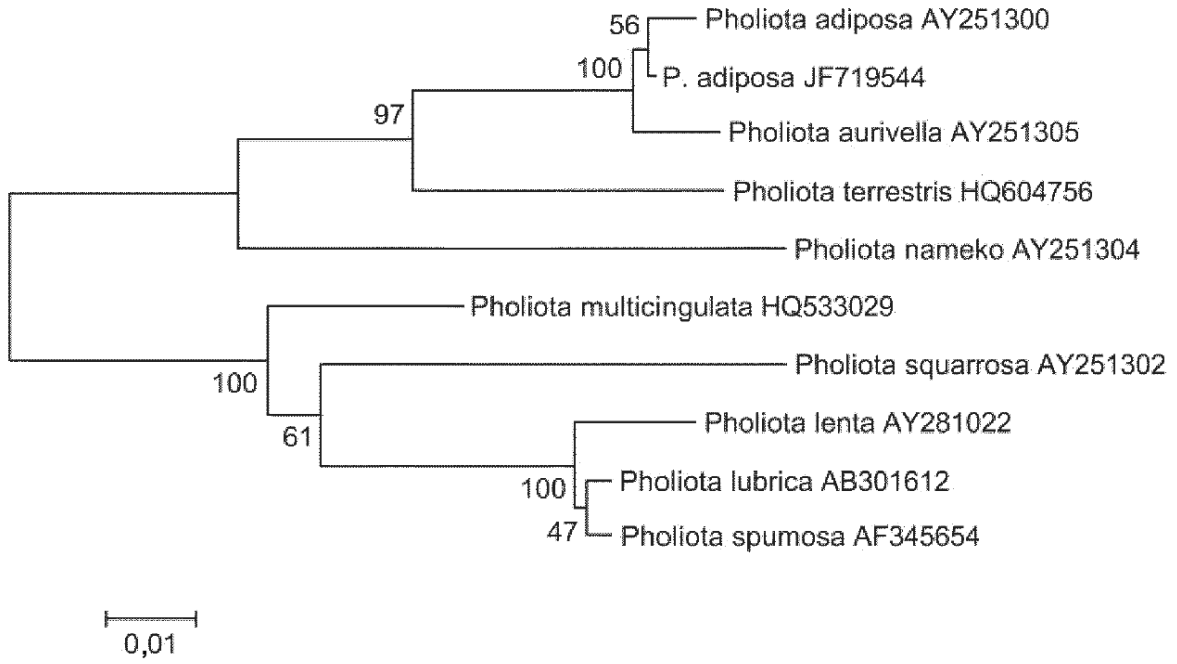


Figura 2a

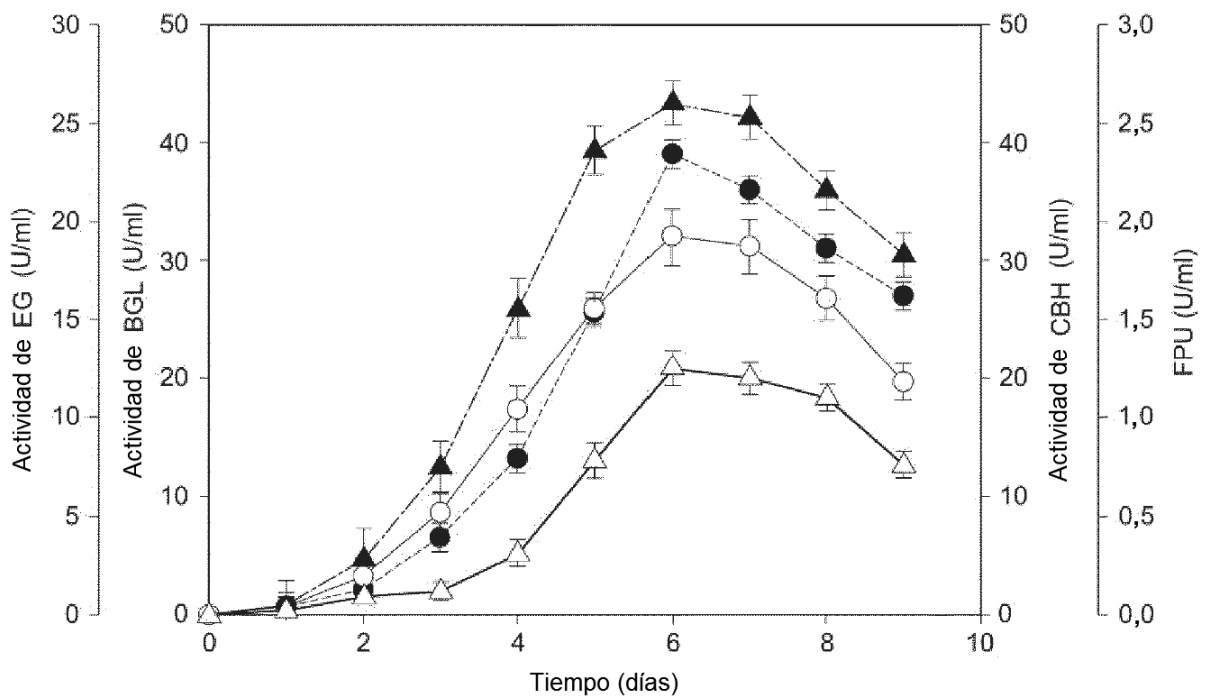


Figura 2b

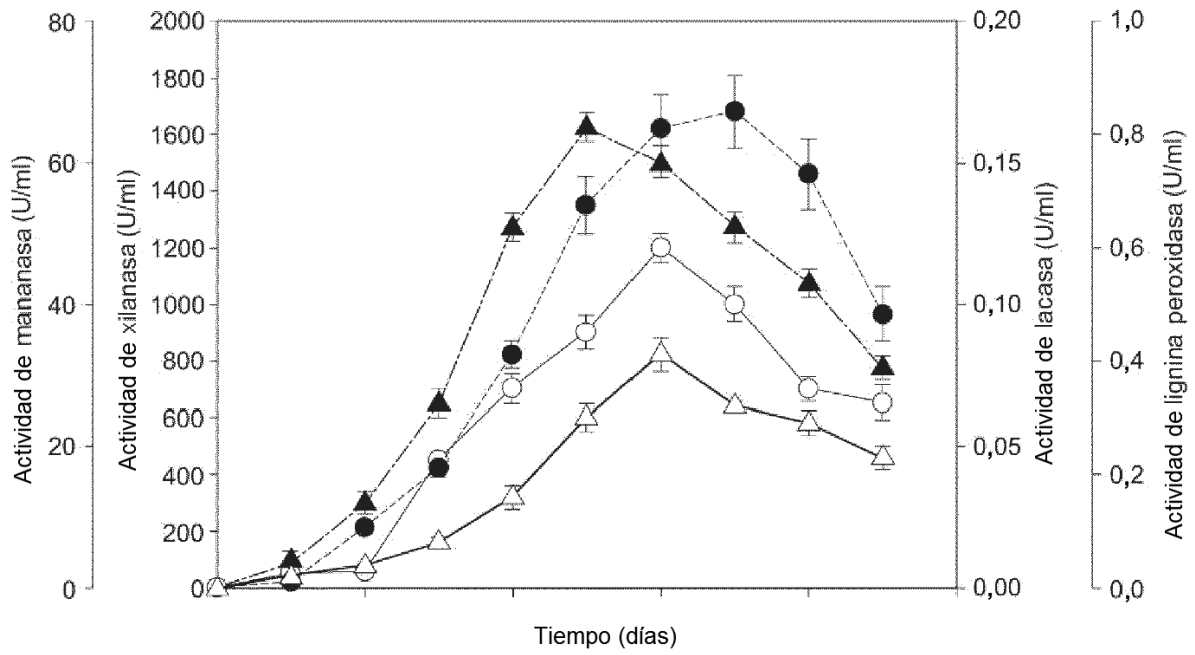


Figura 3a

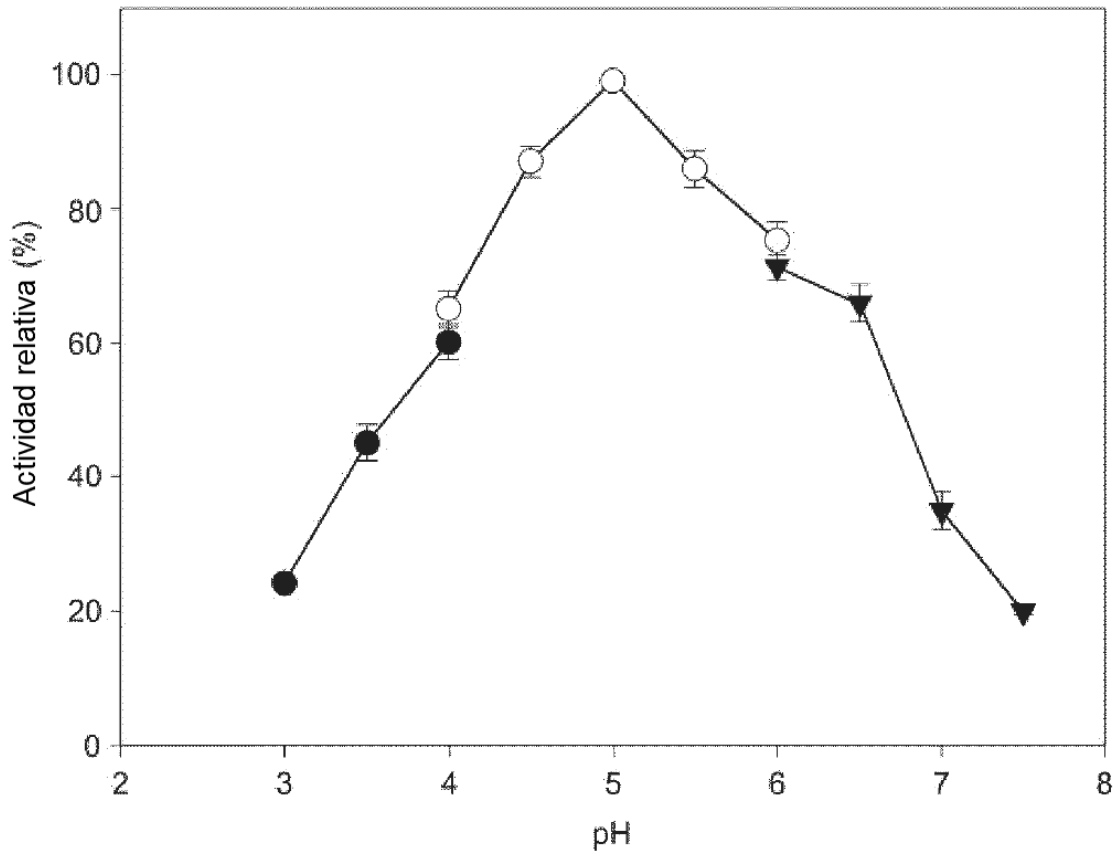


Figura 3b

