

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 552**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/EP2013/055867**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14146713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13710440 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2976432**

54 Título: **Método para mejorar el rendimiento de azúcares fermentables al usar una proteína de envuelta de esporas de Bacillus (COTA)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2017

73 Titular/es:

**METGEN OY (100.0%)
Rakentajantie 26
20780 Kaarina, FI**

72 Inventor/es:

**BIRIKH, KLARA y
AZHAYEV, ALEXEY**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 639 552 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

Método para mejorar el rendimiento de azúcares fermentables al usar una proteína de envuelta de esporas de Bacillus (COTA)

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a procedimientos para la conversión de biomasa en carbohidratos, azúcares fermentables importantes. Proporciona métodos para incrementar el rendimiento de la digestión enzimática de una biomasa, en particular en los casos en los que la celulosa se convierte en azúcares, usando una mezcla de enzimas degradadoras de celulosa y una lacasa, que es la proteína de envuelta de esporas de Bacillus CotA.

Antecedentes de la invención

- 10 La celulosa y la lignina de las plantas están entre las fuentes de carbono renovables más destacadas. Estas moléculas están comprendidas en las plantas como estructuras de lignocelulosa; fibras de polímeros celulósicos enmarañadas en una red de polímeros de lignina. La lignocelulosa está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina puede constituir hasta 25% de la biomasa lignocelulósica. Para la producción de azúcares fermentables, especies herbáceas Miscanthus, virutas de madera y los subproductos del mantenimiento ce
15 césped y árboles son algunos de los materiales lignocelulósicos más populares. El rastrojo de maíz, Panicum virgatum (pasto varilla) y Miscanthus son los principales materiales de biomasa que se estudian actualmente, debido a su alta productividad por hectárea. Sin embargo, la celulosa está contenida en casi todas las plantas, árboles y arbustos naturales de crecimiento libre, en prados, bosques y campos de todo el mundo sin esfuerzo agrícola o coste necesarios para hacerlos crecer.

- 20 La fracción celulósica de diversas lignocelulosas es una estructura uniforme que consiste en unidades de glucosa con enlaces β -1,4. Sin embargo, la biodegradabilidad de la celulosa puede variar entre plantas, dependiendo de la fuerza de la asociación de la celulosa con otros compuestos vegetales. La composición y la proporción de la hemicelulosa y la lignina dependen mucho de la naturaleza del material. Hay más lignina en las maderas blandas (por ejemplo, picea) que en las maderas duras (por ejemplo, sauce) o los residuos agrícolas (por ejemplo, paja de trigo o bagazo de caña de azúcar), lo que convierte a la madera blanda en un material particularmente estimulante para la producción de etanol. El principal componente de la hemicelulosa de madera dura y residuos agrícolas es el xilano, mientras que el de la madera blanda es principalmente manano.

- 30 Existen esencialmente dos modos de producir etanol a partir de celulosa. En primer lugar, existen procedimientos de celulolisis que consisten en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos a veces pretratados, usando enzimas para romper la celulosa compleja en azúcares simples tales como glucosa, seguido por fermentación y destilación. En segundo lugar, también existe una gasificación que transforma la materia prima lignocelulósica en monóxido de carbono e hidrógeno gaseosos. A continuación, estos gases se pueden convertir en etanol mediante fermentación o
35 catálisis química.

- El procedimiento que implica la celulolisis se puede dividir típicamente en varios pasos: en primer lugar, puede haber una fase de "pretratamiento" para hacer al un material lignocelulósico tal como madera o paja más propenso a la hidrólisis. Una etapa de hidrólisis (la celulolisis real), para romper las moléculas en azúcares seguida por la
40 separación de la solución sacárica de los materiales residuales, principalmente lignina, seguido por la fermentación microbiana de la solución sacárica y la destilación para producir alcohol puro aproximadamente al 95%.

- Aunque la lignocelulosa es la fuente de material vegetal más abundante, su sensibilidad se ha visto reducida por su estructura rígida. Como resultado, se necesita un pretratamiento eficaz para liberar la celulosa de la junta de lignina y su estructura cristalina a fin de hacer accesible a una etapa de hidrólisis posterior. Hasta ahora, la mayoría de los pretratamientos se realizan a través de medios físicos o químicos.

- El pretratamiento físico a menudo se denomina reducción del tamaño para reducir el tamaño físico de la biomasa. El pretratamiento químico es para retirar barreras químicas de modo que las enzimas puedan tener acceso a la
50 celulosa para la destrucción enzimática.

- Hasta la fecha, técnicas de pretratamiento disponibles incluyen hidrólisis ácida, explosión de vapor de agua, expansión de fibras con amoníaco, Organosolve, pretratamiento al sulfito para vencer la resistencia de la lignocelulosa, oxidación húmeda alcalina y pretratamiento con ozono.

- 55 En el pretratamiento catalizado por ácido, la mayor parte de la hemicelulosa se degrada, y la celulosa tiene que ser hidrolizada mediante el uso de celulasas, mientras que en el pretratamiento catalizado por álcali, parte de la lignina se retira y, además de las celulasas, también son necesarias hemicelulasas para hidrolizar los polisacáridos restantes.

La hidrólisis completa de celulosa y hemicelulosa requiere un cóctel de enzimas bien diseñado que consiste en endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas, xilanasas, mananasas y diversas enzimas que actúan sobre las cadenas laterales de xilanos y mananos.

Debido a la estructura resistente de las lignocelulosas, se puede requerir una etapa de pretratamiento antes de la hidrólisis enzimática a fin de hacer a la celulosa más accesible a las enzimas. A pesar de las investigaciones anteriores, la mayoría de los procedimientos de tratamiento no son eficaces cuando se aplican a materias primas con alto contenido de lignina, tales como biomasa de bosques. La presente invención trata este problema.

10 Sumario de la invención

Se ha encontrado que una proteína de envuelta de esporas de *Bacillus subtilis* denominada CotA podría mejorar mucho el rendimiento de la digestión enzimática de material lignocelulósico. La invención se refiere con eso a un método para producir un azúcar fermentable a partir de un material lignocelulósico en donde el material lignocelulósico se pone en contacto con una lacasa y una mezcla de enzimas degradadoras de celulosa bien simultáneamente o bien de un modo secuencialmente diferido, en donde la lacasa es la proteína de envuelta de esporas de *Bacillus* CotA.

También se proporciona en la presente un ácido nucleico aislado que codifica una proteína útil en el método anterior, teniendo la proteína actividad de lacasa y una secuencia de aminoácidos primaria que es al menos 93% idéntica a la secuencia de COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2, documento WO 2013/038062)). La descripción también proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de lacasa codificado por una secuencia de ADN aislada como la descrita anteriormente o un polipéptido aislado que tiene actividad de lacasa con una secuencia de aminoácidos primaria que es al menos 93% idéntica a la secuencia de COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2).

Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado sorprendentemente que el rendimiento de un procedimiento enzimático para producir azúcares fermentables a partir de material lignocelulósico se puede mejorar mucho cuando una proteína de envuelta de esporas de *Bacillus* denominada CotA se añade al material lignocelulósico junto o de un modo secuencialmente diferido con una mezcla de enzimas degradadoras de celulosa. En una serie de experimentos, se pudo mostrar que esta proteína CotA superaba a otras lacasas, tanto de origen bacteriano como fúngico.

Furtado y cols., *Protein Engineering, Design and Selection* 26: 15 - 23 (2013) describen una enzima bifuncional recombinante creada al fusionar dos enzimas de *Bacillus subtilis*: la beta-1,3-1,4 glucanasa (EC 3.2.1.73) y una lacasa Cot A (EC 1.10.3.2). La enzima de fusión mostraba actividad tanto de lacasa como de glucanasa. Sin embargo, solamente se podía mostrar una mejora en la liberación de azúcares desde bagazo de caña de azúcar molido cuando se añadía ABTS a la mezcla de reacción.

Moilanen y cols., *Enzyme and Microbial Technology* 49 (2011) 492-498 divulga el uso de enzimas modificadoras de lignina tales como lacasas junto con celulasas a fin de modificar o retirar parcialmente lignina de la biomasa. Ejemplifica el uso de lacasa de *Cerrena unicolor* PM170798 (FBCC 387) y una lacasa procedente de *Trametes hirsuta* VTT D-443. *Cerrena* y *Trametes* son ambas especies del reino de Fungi.

De ahí que la descripción proporcione un método para producir un azúcar fermentable a partir de un material lignocelulósico en el que el material lignocelulósico se incubaba con una lacasa y una mezcla de enzimas degradadoras de celulosa, bien simultáneamente o bien de un modo secuencialmente diferido, en donde la lacasa es la proteína de envuelta de esporas de *Bacillus* CotA.

Ejemplos de un material lignocelulósico que se puede tratar ventajosamente con los métodos que se describen en la presente incluyen materiales que comprenden rastrojos de maíz, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, residuos de jardines, residuos madereros y forestales, caña de azúcar, pasto varilla, paja de trigo, heno, cebada, paja de cebada, paja de arroz, hierbas, papel residual, fango o subproductos procedentes de la fabricación de papel, grano de maíz, mazorcas de maíz, cáscaras de maíz, trigo, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, árboles, ramas, virutas de madera, serrín y cualquier combinación de los mismos.

También se proporciona en la presente un método como el descrito anteriormente en el que el material lignocelulósico se selecciona del grupo que consiste en rastrojos de maíz, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, residuos de jardines, residuos madereros y forestales, caña de azúcar, pasto varilla, paja de trigo, heno, cebada, paja de cebada, paja de arroz, hierbas, papel residual, fango o subproductos procedentes de la fabricación de papel, grano de maíz, mazorcas de maíz, cáscaras

ES 2 639 552 T3

de maíz, trigo, paja de trigo, heno, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, árboles, ramas, virutas de madera, serrín y combinaciones de los mismos.

5 El término material lignocelulósico se refiere a un material que comprende (1) celulosa, hemicelulosa o una combinación y (2) lignina. A lo largo de esta divulgación se entiende que celulosa se puede referir a celulosa, hemicelulosa una combinación de las mismas. Celulosa se puede referir a celulosa, hemicelulosa o una combinación de las mismas.

10 También se ha encontrado que se podría mejorar la acción de una multitud de enzimas degradadoras de celulosa. Se proporciona en la presente un método como el descrito anteriormente, en el que la mezcla de enzimas degradadoras de celulosa se selecciona del grupo que consiste en celulasa; hemicelulasa; endoglucanasas [beta] 1-4 (E.C. 3.2.1.4), exoglucanasas [beta] 1-4 (E.C. 3.2.1.9.1), [beta]-glucosidasas (E.C. 3.2.1.2.1), endoxilanasas y combinaciones de las mismas.

15 Las enzimas degradadoras de celulosa se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente. Habitualmente, se ofrecen en preparaciones combinadas, por ejemplo, preparaciones CELLIC CTEC3™ o CTEC2™ (de Novozymes, Dinamarca) que son composiciones de enzimas que comprenden celulasas, [beta]-glucosidasas y hemicelulasa; o CELLIC HTEC3™ o HTEC2™ (también de Novozymes, Dinamarca) que es una composición de enzimas que comprende endoxilanasas y celulasa.

20 En un método alternativo la lacasa CotA se añade al material lignocelulósico junto con o antes de las enzimas degradadoras de celulosa. En otra alternativa, el método se puede emplear para incrementar el rendimiento de azúcares fermentables obtenidos a partir de lignocelulosa con un alto contenido de lignina.

25 En ciertos procedimientos, la temperatura de la biomasa o el material lignocelulósico que se va a tratar puede estar por encima de la temperatura de inactivación de las enzimas. Puesto que una temperatura alta puede inactivar las enzimas al desnaturalizar su cadena de aminoácidos, las enzimas se pueden añadir ventajosamente a la biomasa en un punto por debajo de la temperatura de inactivación de las enzimas. Las enzimas se pueden añadir dentro del intervalo o los intervalos de temperatura funcionales o a la temperatura o las temperaturas óptimas de la enzima. Para ahorrar energía, las enzimas se pueden añadir después de que la biomasa se haya enfriado hasta la temperatura de inactivación y de que el proceso enzimático esté suficientemente completado antes de que la temperatura haya caído por debajo de la temperatura funcional óptima de la enzima. Naturalmente, también es una opción mantener una temperatura deseada al enfriar o calentar la biomasa o el material lignocelulósico. Añadir un líquido de dilución, tal como agua a una cierta temperatura, se puede usar para enfriar la biomasa.

35 En un método alternativo, el procedimiento de pretratamiento de enzimas se puede realizar a una temperatura específica tal como, por ejemplo, a de 30 grados C a 60 grados C; de 40 grados C a 55 grados C; o de 45 grados C a 50 grados C, o a temperatura ambiente o inferior.

40 El contacto de la biomasa con las enzimas se puede realizar durante un período de tiempo de hasta un día. Aunque son posibles digestiones enzimáticas más prolongadas, se puede usar un período de tiempo más corto tal como 60 minutos, 10 horas, 20 horas, 30 horas, 40 horas, 60 horas o 72 horas o cualquier tiempo menor que estos valores o cualquier tiempo entre cualquiera de dos de estos valores por razones prácticas o económicas. En otro método alternativo, las digestiones enzimáticas pueden llevar 50, 100, 150 o 200 horas o cualquier tiempo menor que estos valores o cualquier tiempo entre cualquiera de dos de estos valores. Véase, p. ej., la sección de ejemplos. En una alternativa, un período de contacto enzimático preferido es aproximadamente 3 días o menos.

45 En un método como el descrito en la presente, el material lignocelulósico se puede pretratar ventajosamente. El término "pretratado", según se usa en la presente, se refiere a un tratamiento que se produce antes del tratamiento enzimático, bien lacasas o bien enzimas degradadoras de celulosa o ambas. El pretratamiento puede consistir en un tratamiento con vapor de agua, de modo que el tratamiento con vapor de agua ácido diluido o un tratamiento de explosión de vapor de agua se aplique a la biomasa o el material lignocelulósico. Uno de los fines del tratamiento con vapor de agua es despolimerizar la lignina en la biomasa hasta un grado suficiente para permitir que una enzima o mezcla de enzimas convierta la celulosa y la hemicelulosa de la biomasa en azúcares menos complejos en una etapa posterior.

55 Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que tienen una amplia distribución taxonómica y pertenecen al grupo de las multicobre oxidasas. Las lacasas son catalizadores ecológicos que usan oxígeno molecular procedente del aire para oxidar diversos compuestos fenólicos y no fenólicos relacionados con la lignina así como contaminantes medioambientales muy resistentes, y producen agua como el único producto secundario. Estos catalizadores "verdes" naturales se usan para diversas aplicaciones industriales incluyendo la detoxificación de efluentes industriales, principalmente procedentes de las industrias del papel y la pasta papelera, textil y petroquímica, el uso como agente de biorremediación para depurar herbicidas, plaguicidas u ciertos explosivos en el suelo. Las lacasas también se usan como agentes depuradoras para ciertos sistemas de purificación de agua. Además, su capacidad para retirar sustancias xenobióticas y producir productos poliméricos las convierte en una herramienta útil con propósitos de biorremediación.

Las lacasas fueron descubiertas originalmente en los hongos, son particularmente muy estudiadas en hongos de putrefacción blanca y hongos de putrefacción parda. Más tarde, las lacasas también se encontraron en plantas y bacterias. Las lacasas tienen una amplia especificidad para sustratos; aunque diferentes lacasas puedan tener preferencias para el sustrato algo diferentes. La principal característica de la enzima lacasa es su potencial redox, y, según este parámetro todas las lacasas se pueden dividir en tres grupos (véase, por ejemplo, Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. a., Shleev, S. V., & Yaropolov, a. I. (2007). "Blue" lacasas. *Biochemistry (Moscú)*, 72(10), 1136-1150. doi:10.1134/S0006297907100112): lacasas de potencial redox alto (0,7-0,8 V), lacasas de potencial redox medio (0,4-0,7 V) y lacasas de potencial redox bajo (<0,4V). Se cree que un potencial redox bajo limita el alcance de sustratos que la enzima puede oxidar, y viceversa. Todas las lacasas de potencial redox alto y la parte superior de las lacasas de potencial redox medio son lacasas fúngicas. La aplicación industrial de las lacasas se basa principalmente si no totalmente en las lacasas fúngicas.

CotA es una lacasa bacteriana y es un componente de las capas externas de la endospora de bacillus. Es una proteína de 65 kDa codificada por el gen cotA (Martins, O., Soares, M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., & Henriques, A. O. (2002). Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of the *Bacillus subtilis* Endospore Coat. *Biochemistry*, 277(21), 18849 - 18859. doi:10.1074/jbc.M200827200). CotA pertenece a un grupo diverso de multicobre oxidasas "azules" que incluye las lacasas. Esta proteína muestra alta termoestabilidad y resistencia a diversos elementos nocivos según las capacidades de supervivencia de la endospora. Se ha presentado que el potencial redox de esta proteína es de alrededor de 0,5 mV, lo que la sitúa en el intervalo de las lacasas de potencial redox medio.

En cuanto a la estructura primaria, las lacasas son diversas. En muchos casos las lacasas pueden no tener en absoluto una homología de secuencia significativa con todos los otros miembros de la multicobre oxidasas.

Las lacasas CotA representan un grupo bastante compacto y bien definido de secuencias. Se realizó una búsqueda por Blast de las secuencias procedentes del banco de datos de proteínas (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) que tienen homología con secuencias preferidas de esta solicitud de patente denominadas proteína COT1 (SEQ ID N°: 1) y proteína COT2 (SEQ ID N°: 2).

Esta búsqueda reveló un grupo muy compacto de secuencias que muestran entre 98% y 91% de identidad con la secuencia de COT2. Otro grupo de secuencias consistía exclusivamente en lacasas de la envuelta de esporas de la especie *Bacillus*, que tenían una identidad entre 78% y 82% con la secuencia de COT1.

El documento CN102154150 divulga una lacasa WN01 de *Bacillus subtilis* (CGMCC N° 4265), su secuencia nucleotídica (SEQ ID N°: 1) y su secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 2). La SEQ ID N°: 2 del documento CN 102154150 es 97% idéntica con COT1 de la presente solicitud (SEQ ID N°: 1) y 99% idéntica con COT2 de la presente solicitud (SEQ ID N°: 2).

En el grupo de secuencias con una identidad de 60% o más, todas las secuencias eran proteínas de envuelta de esporas procedentes de la especie *Bacillus*, productos de los genes CotA correspondientes.

El alineamiento de la lacasa COTA, GenBank: BAA22774.1 con lacasa fúngica de *Trametes versicolor* (GenBank: CAA77015) usando la fuente de "2 secuencias Blast" en línea (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq) muestra que solo 54% de la longitud de la secuencia se podía alinear con una identidad en la sección alineada de 22%. El alineamiento de COT2 (SEQ ID N°: 2, una enzima CotA preferida) con otra lacasa bacteriana - CuEO de *E.coli* (zip_03034325.1) mostraba 29% de identidad. De modo que se puede decir que la lacasa CotA no tiene identidad u homología significativas con otras lacasas.

Para los propósitos de esta invención, CotA se define en la presente como una proteína aislada con actividad de lacasa con una estructura de aminoácidos primaria que es al menos 60% idéntica a la secuencia según SEQ ID N°: 2. Preferiblemente, CotA tiene una estructura primaria que es al menos 60% idéntica a la secuencia según SEQ ID N°: 2, tal como al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100%.

La descripción también proporciona enzimas y métodos para su uso. De ahí que la descripción también proporcione un método como el descrito anteriormente en el que la lacasa CotA lacasa tiene una estructura de aminoácidos primaria que es al menos 60% idéntica a la secuencia de COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2). En una mejora adicional del método, la lacasa CotA es COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2).

La descripción también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que tiene actividad de lacasa y una secuencia de aminoácidos primaria que es al menos 93% idéntica a la secuencia de COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2).

La descripción también proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de lacasa codificado por una secuencia de ADN aislada como la descrita anteriormente. La descripción también proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de lacasa con una secuencia de aminoácidos primaria que es al menos 60% idéntica a la secuencia de COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2).

5 **Leyenda para la figura**

Figura 1 Efecto de lacasas sobre el rendimiento de azúcares reductores a partir de biomasa lignocelulósica. La hidrólisis enzimática del material lignocelulósico (cartón corrugado viejo) se realizó usando un cóctel de celulasas comercial para aplicaciones de biocombustible bajo condiciones recomendadas, con o sin lacasas. Las lacasas se añadieron (según se indica) a la concentración 1 ukat/g (60 unidades/g) de sustancia seca, directamente a las mezclas de hidrólisis junto con celulasas. Se usaron las siguientes lacasas: "Lacasa fúngica 1" procedente de *Trametes versicolor*, "lacasa fúngica 2" procedente de *Pleurotus ostreatus*, y proteína de envuelta de esporas "CotA" procedente de *Bacillus subtilis*. Los rendimientos de azúcares reductores se determinaron mediante el método de DNS. El rendimiento de la reacción de control sin lacasa ("celulasa") se tomó como 100% y se calcularon los rendimientos relativos para las muestras correspondientes que contenían lacasas.

15 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Efecto de diferentes lacasas sobre el rendimiento de azúcares a partir de la hidrólisis enzimática de un sustrato lignocelulósico.

Trozos de cartón corrugado viejo se sometieron a hidrólisis enzimática. Se llevaron a cabo experimentos en paralelo en los que la hidrólisis de celulosa se realizó en ausencia de lacasa o en presencia de una de las tres lacasas:

20 (1) Proteína de envuelta de esporas procedente de *Bacillus subtilis* CotA (COT2 (SEQ ID N°: 2, expresada recombinantemente en *E. coli*), (2) lacasa fúngica disponible comercialmente de hongos de podredumbre blanca *Trametes versicolor* (disponible de Sigma-Aldrich), y (3) lacasa procedente del hongos de podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus* expresada recombinantemente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Piscitelli, A., Giardina, P., Mazzoni, C., & Sanna, G. (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(4), 428-39. doi:10.1007/s00253-005-0004-z).

30 Los trozos de cartón corrugado viejo se pretrataron con NaOH al 0,5% con 15% de consistencia (consistencia significa porcentaje de materia seca en la suspensión, p/v) durante 1 h a 90 grados Celcius, a continuación el material se lavó con agua, se secó y se sometió a hidrólisis enzimática con 5% de consistencia en ácido succínico 100 mM (pH 5,0).

35 La hidrólisis enzimática de la celulosa se llevó a cabo usando cóctel de celulasas disponible comercialmente para aplicaciones de biocombustible, CMAX (Alternafuel) de Diadick usando la concentración de celulasas recomendada por el fabricante.

40 Todas las lacasas se usaron en una concentración de 1 microkatal/g (60 unidades/g de materia prima seca. Un se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 mol de sustrato (ABTS) en 1 s. Una unidad catalítica se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 micromol de sustrato (ABTS) en 1 min) y añadidas directamente a la reacción de hidrólisis.

45 La hidrólisis se llevó a cabo a 60 grados Celsius durante 72 h. Después de la hidrólisis, los niveles de azúcares reductores se determinaron mediante el método del ácido dinitrosalicílico (método del DNS, Sadasivam S., Manickam A., "Carbohydrates" en *Biochemical methods*, New Age Internatioal Ltd Publishers, 2ª edición, 2005, p.6).

Los resultados se muestran en la figura 1. Se observó un gran incremento en el rendimiento cuando el material lignocelulósico se incubaba simultáneamente con CotA y las enzimas celulasa. Se alcanzaba un incremento de aproximadamente 250% en comparación con celulasas combinadas con hongos de podredumbre blanca *Trametes versicolor* o lacasa procedente de hongos de podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus*. Se obtenían resultados muy similares cuando el tratamiento con lacasas se realizaba antes del tratamiento con celulasas.

50 **Ejemplo 2: Hidrólisis enzimática de diversas materias primas lignocelulósicas**

La hidrólisis enzimática de diversas materias primas lignocelulósicas se llevó a cabo a fin de evaluar el efecto del tratamiento con lacasa CotA sobre el rendimiento de azúcares (Tabla 1).

Se usaron los siguientes sustratos lignocelulósicos:

ES 2 639 552 T3

5 Paja de trigo explosionada con vapor de agua: la explosión de vapor de agua se realizó en un instrumento de explosión de vapor de agua a 200 grados Celsius durante 2,5 min, la suspensión después de la explosión de vapor de agua se lavó con agua y se secó. Cartón corrugado viejo se trató con NaOH al 0,5% con 15% de consistencia durante 1 h a 90 grados Celsius, a continuación el material se lavó con agua y se secó. La pasta papelera de eucalipto es pasta papelera (fibras de madera) obtenida mediante formación química de pasta papelera (formación de pasta papelera kraft) y recogida después de la etapa de blanqueo. Son fibras de celulosa prácticamente puras con pequeños vestigios de lignina. La pasta papelera soplada de madera blanda (picea) y la pasta papelera soplada de madera dura (abedul) son pastas papeleras (fibras de madera) obtenidas mediante formación química de pasta papelera (formación de pasta papelera kraft) recogida antes de la etapa de blanqueo procedente del depósito de 10 soplado que seca la pasta papelera después de la cocción química. Estas pastas papeleras contienen aproximadamente 3% de lignina y 97% de celulosa. La pasta papelera de pino es pasta papelera obtenida a partir de pino mediante un procedimiento termomecánico de formación de pasta papelera, se recogió antes del blanqueo y contiene aproximadamente 25% de lignina y 75% de celulosa.

15 La hidrólisis enzimática de la celulosa se llevó a cabo usando un cóctel de celulasas disponible comercialmente para aplicaciones de biocombustibles, CMAX (Alternafuel) de Diadick. Los sustratos lignocelulósicos secados que se describen anteriormente se sometieron a hidrólisis enzimática con 5% de consistencia en ácido succínico 100 mM (pH 5,0) usando la concentración de celulasas recomendada por el fabricante. La lacasa CotA (cuando se indique) se añadió a las reacciones de hidrólisis a una concentración 1 microkatal/g de materia prima seca (que corresponde a 60 unidades/g. Un katal se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 mol de sustrato (ABTS) en 1 s, una unidad catalítica se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 micromol de sustrato (ABTS) en 1 min). La hidrólisis se llevó a cabo a 60 grados Celsius durante 72 h.

25 Después de la hidrólisis, los niveles de azúcares reductores se determinaron mediante el método del ácido dinitrosalicílico (método del DNS, Sadasivam, 2005). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Se concluía que los rendimientos de la celulosa se mejoraban mucho al añadir una lacasa CotA a la mezcla de reacción, independientemente de la fuente de la lignocelulosa.

30 Se encontró notablemente que una biomasa que virtualmente no contenía lignina o no contenía lignina en absoluto (tal como pasta papelera de eucalipto) también podía servir como un sustrato en un método como el descrito en la presente. Incluso con esos materiales, el rendimiento de la celulosa se mejoraba notablemente cuando se usaba una lacasa CotA en combinación con la celulosa. Como se muestra en la tabla 1, el rendimiento a partir de pasta papelera de eucalipto se incrementaba con 157% hasta un rendimiento que era 92% del rendimiento teórico.

35 Tabla 1 Mejora del rendimiento de azúcares con lacasa CotA.

Material lignocelulósico	Celulosa [mg de azúcar/gramo de materia prima)	Celulosa + lacasa CotA [mg de azúcar/gramo de materia prima)	Mejora del rendimiento	Rendimiento teórico [mg de azúcar/gramo de materia prima)	Porcentaje del rendimiento teórico
Paja de trigo explosionada con vapor de agua	433	556	128%	650	85%
Cartón corrugado viejo (OCC)	83	214	259%	690	31%
Pasta papelera de pino	219	532	243%	750	71%
Pasta papelera de eucalipto	586	922	157%	1000	92%
Pasta papelera soplada (madera blanda)	429	840	196%	970	86%
Pasta papelera soplada (madera dura)	542	950	175%	970	98%

Lista de secuencias

<110> MetGen Oy

<120> Método para mejorar el rendimiento de azúcares fermentables a partir de sustratos lignocelulósicos

<130> 255 WOP0

5 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 513

< 212> PRT

10 < 213> Bacillus subtilis

<400> 1

Met Thr Leu Glu Lys Phe Val Asp Ala Leu Pro Ile Pro Asp Thr Leu
1 5 10 15

Lys Pro Val Gln Gln Thr Thr Glu Lys Thr Tyr Tyr Glu Val Thr Met
20 25 30

Glu Glu Cys Ala His Gln Leu His Arg Asp Leu Pro Pro Thr Arg Leu
35 40 45

Trp Gly Tyr Asn Gly Leu Phe Pro Gly Pro Thr Ile Glu Val Lys Arg
50 55 60

Asn Glu Asn Val Tyr Val Lys Trp Met Asn Asn Leu Pro Ser Glu His
65 70 75 80

Phe Leu Pro Ile Asp His Thr Ile His His Ser Asp Ser Gln His Glu
85 90 95

Glu Pro Glu Val Lys Thr Val Val His Leu His Gly Gly Val Thr Pro
100 105 110

Asp Asp Ser Asp Gly Tyr Pro Glu Ala Trp Phe Ser Lys Asp Phe Glu
115 120 125

Gln Thr Gly Pro Tyr Phe Lys Arg Glu Val Tyr His Tyr Pro Asn Gln
130 135 140

Gln Arg Gly Ala Ile Leu Trp Tyr His Asp His Ala Met Ala Leu Thr
145 150 155 160

Arg Leu Asn Val Tyr Ala Gly Leu Val Gly Asp Tyr Ile Ile His Asp
165 170 175

ES 2 639 552 T3

Pro Lys Glu Lys Arg Leu Lys Leu Pro Ser Gly Glu Tyr Asp Val Pro
 180 185 190

Leu Leu Ile Thr Asp Arg Thr Ile Asn Glu Asp Gly Ser Leu Phe Tyr
 195 200 205

Pro Ser Gly Pro Glu Asn Pro Ser Pro Ser Leu Pro Lys Pro Ser Ile
 210 215 220

Val Pro Ala Phe Cys Gly Asp Thr Ile Leu Val Asn Gly Lys Val Trp
 225 230 235 240

Pro Tyr Leu Glu Val Glu Pro Arg Lys Tyr Arg Phe Arg Val Ile Asn
 245 250 255

Ala Ser Asn Thr Arg Thr Tyr Asn Leu Ser Leu Asp Asn Gly Gly Glu
 260 265 270

Phe Ile Gln Ile Gly Ser Asp Gly Gly Leu Leu Pro Arg Ser Val Lys
 275 280 285

Leu Asn Ser Phe Ser Leu Ala Pro Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Ile Ile
 290 295 300

Asp Phe Thr Ala Tyr Glu Gly Glu Ser Ile Ile Leu Ala Asn Ser Glu
 305 310 315 320

Gly Cys Gly Gly Asp Ala Asn Pro Glu Thr Asp Ala Asn Ile Met Gln
 325 330 335

Phe Arg Val Thr Lys Pro Leu Ala Gln Lys Asp Glu Ser Arg Lys Pro
 340 345 350

Lys Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Ser Val Gln Asn Glu Arg Ile Gln Asn
 355 360 365

Ile Arg Thr Leu Lys Leu Ala Gly Thr Gln Asp Glu Tyr Gly Arg Pro
 370 375 380

Val Leu Leu Leu Asn Asn Lys Arg Trp His Asp Pro Val Thr Glu Ala
 385 390 395 400

Pro Lys Ala Gly Thr Thr Glu Ile Trp Ser Ile Val Asn Pro Thr Gln
 405 410 415

Gly Thr His Pro Ile His Leu His Leu Val Ser Phe Arg Val Leu Asp
 420 425 430

ES 2 639 552 T3

Arg Arg Pro Phe Asp Ile Ala Arg Tyr Gln Glu Arg Gly Glu Leu Ser
 435 440 445

Tyr Thr Gly Pro Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Glu Lys Gly Trp Lys
 450 455 460

Asp Thr Ile Gln Ala His Ala Gly Glu Val Leu Arg Ile Ala Val Thr
 465 470 475 480

Phe Gly Pro Tyr Ser Gly Arg Tyr Val Trp His Cys His Ile Leu Glu
 485 490 495

His Glu Asp Tyr Asp Met Met Arg Pro Met Asp Ile Thr Asp Pro His
 500 505 510

Lys

<210> 2

< 211> 539

< 212> PRT

5 < 213> Bacillus subtilis

<400> 2

Met Thr Leu Glu Lys Phe Val Asp Ala Leu Pro Ile Pro Asp Thr Leu
 1 5 10 15

Lys Pro Val Gln Gln Ser Lys Glu Lys Thr Tyr Tyr Glu Val Thr Met
 20 25 30

Glu Glu Cys Thr His Gln Leu His Arg Asp Leu Pro Pro Thr Arg Leu
 35 40 45

Trp Gly Tyr Asn Gly Leu Phe Pro Gly Pro Thr Ile Glu Val Lys Arg
 50 55 60

Asn Glu Asn Val Tyr Val Lys Trp Met Asn Asn Leu Pro Ser Thr His
 65 70 75 80

Phe Leu Pro Ile Asp His Thr Ile His His Ser Asp Ser Gln His Glu
 85 90 95

Glu Pro Glu Val Lys Thr Val Val His Leu His Gly Gly Val Thr Pro
 100 105 110

Asp Asp Ser Asp Gly Tyr Pro Glu Ala Trp Phe Ser Lys Asp Phe Glu
 115 120 125

ES 2 639 552 T3

Gln Thr Gly Pro Tyr Phe Lys Arg Glu Val Tyr His Tyr Pro Asn Gln
 130 135 140

Gln Arg Gly Ala Ile Leu Trp Tyr His Asp His Ala Met Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Arg Leu Asn Val Tyr Ala Gly Leu Val Gly Ala Tyr Ile Ile His Asp
 165 170 175

Pro Lys Glu Lys Arg Leu Lys Leu Pro Ser Glu Glu Tyr Asp Val Pro
 180 185 190

Leu Leu Ile Thr Asp Arg Thr Ile Asn Glu Asp Gly Ser Leu Phe Tyr
 195 200 205

Pro Ser Gly Pro Glu Asn Pro Ser Pro Ser Leu Pro Asn Pro Ser Ile
 210 215 220

Val Pro Ala Phe Cys Gly Glu Thr Ile Leu Val Asn Gly Lys Val Trp
 225 230 235 240

Pro Tyr Leu Glu Val Glu Pro Arg Lys Tyr Arg Phe Arg Val Ile Asn
 245 250 255

Ala Ser Asn Thr Arg Thr Tyr Asn Leu Ser Leu Asp Asn Gly Gly Glu
 260 265 270

Phe Ile Gln Ile Gly Ser Asp Gly Gly Leu Leu Pro Arg Ser Val Lys
 275 280 285

Leu Thr Ser Phe Ser Leu Ala Pro Ala Glu Arg Tyr Asp Ile Ile Ile
 290 295 300

Asp Phe Thr Ala Tyr Glu Gly Gln Ser Ile Ile Leu Ala Asn Ser Ala
 305 310 315 320

Gly Cys Gly Gly Asp Val Asn Pro Glu Thr Asp Ala Asn Ile Met Gln
 325 330 335

Phe Arg Val Thr Lys Pro Leu Ala Gln Lys Asp Glu Ser Arg Lys Pro
 340 345 350

Lys Tyr Leu Ala Ser Tyr Pro Ser Val Gln Asn Glu Arg Ile Gln Asn
 355 360 365

Ile Arg Thr Leu Lys Leu Ala Gly Thr Gln Asp Glu Tyr Gly Arg Pro

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir un azúcar fermentable a partir de un material lignocelulósico en el que el material lignocelulósico se pone en contacto con una α -lacasa y una mezcla de enzimas degradadoras de celulosa, bien simultáneamente o bien de un modo secuencialmente diferido, en el que la lacasa es la proteína de envuelta de esporas de *Bacillus CotA*.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el material lignocelulósico se selecciona del grupo que consiste en rastrojos de maíz, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, residuos de jardines, residuos madereros y forestales, caña de azúcar, pasto varilla, paja de trigo, heno, cebada, paja de cebada, paja de arroz, hierbas, papel residual, fango o subproductos procedentes de la fabricación de papel, grano de maíz, mazorcas de maíz, cáscaras de maíz, trigo, bagazo de caña de azúcar, sorgo, soja, árboles, ramas, virutas de madera, serrín y cualquier combinación de los mismos.
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la mezcla de enzimas degradadoras de celulosa consiste en una combinación de enzimas seleccionadas del grupo que consiste en celulasas; hemicelulasas; endoglucanasas [beta] 1-4 (E.C. 3.2.1.4), exoglucanasas [beta] 1-4 (E.C. 3.2.1.9.1), [beta]-glucosidasas (E.C. 3.2.1.2.1) y endoxilanasas.
- 20 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, en el que el material lignocelulósico se pretrata antes de que el material se ponga en contacto con una lacasa y una mezcla de enzimas degradadoras de celulosa.
5. Método según la reivindicación 5, en el que el pretratamiento consiste en una etapa de explosión de vapor de agua.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, en el que la lacasa CotA tiene una estructura de aminoácidos primaria que es al menos 60% idéntica a la secuencia de COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2).
7. Método según la reivindicación 6, en el que CotA es COT1 (SEQ ID N°: 1) o COT2 (SEQ ID N°: 2).

Figura 1

