



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

55
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

RET

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-132157

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO COMPOSICIONES DE SWOLLEMINA Y METODOS
DE INCREMENTAR LA EFICIENCIA DE UNA CELULASA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE DANISCO US INC.

DOMICILIO 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, E. U. A.

74. APODERADO JERÓNIMO CASTILLO BONILLA

22. BOGOTÁ, D.C.,

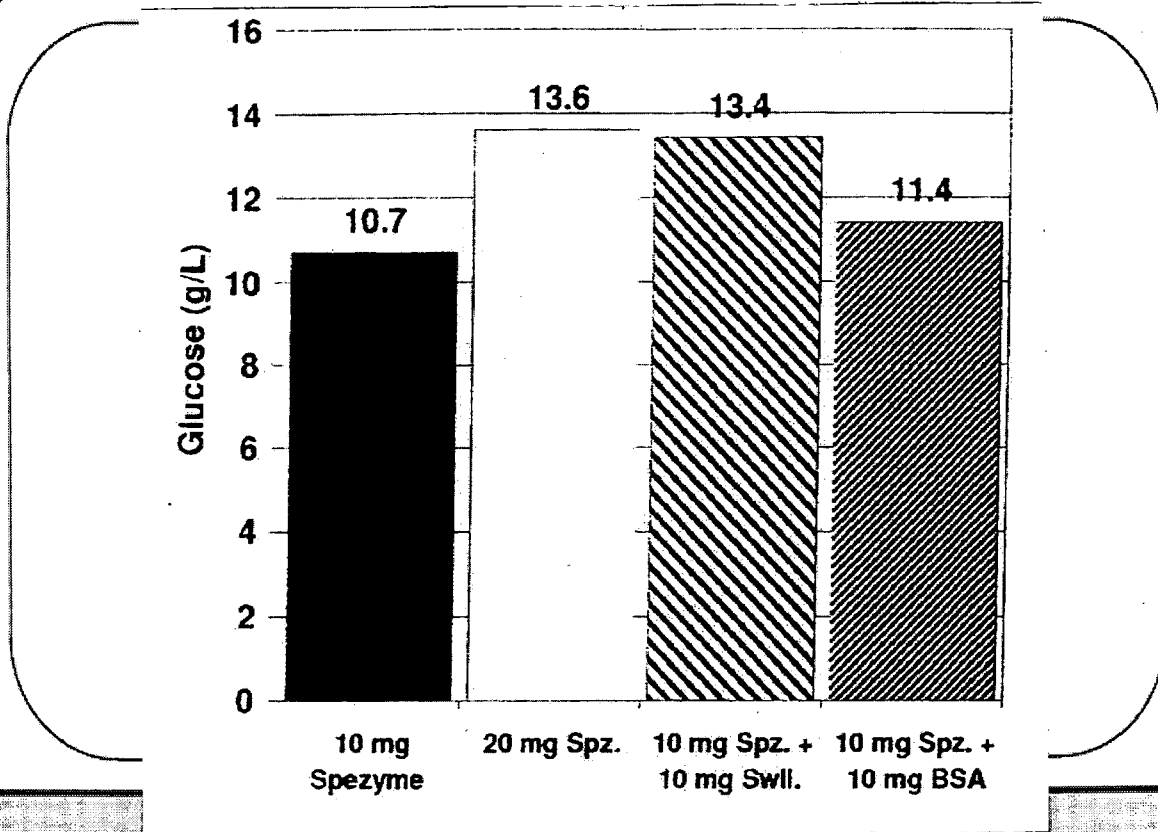
PETITORIO			
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 10-132157- -00000-0000 Fecha: 2010-10-25 16:29:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I Act. 411 PRESENTACION Folios: 69	
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL			
SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capítulo I ☐ Capítulo II			
2 SOLICITANTE		IDENTIFICACIÓN	
Nombre: DANISCO US, INC Dirección: 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, Estados Unidos de America Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense Lugar de Constitución: Delaware Teléfono: Fax: E-mail:		☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cuál Número	
3 REPRESENTANTE O APODERADO		IDENTIFICACIÓN	
Nombre: JERÓNIMO CASTILLO BONILLA Dirección: Calle 93A No. 14-17 Oficina 311, Bogotá, D.C. Teléfono: 236 34 93 Fax: 218 23 51 E-mail: info@pcastillopineda.com		☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cuál Número 79.462.057 TP 104167	
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).			
4 INVENTOR (ES) (72)		Nombre: HUANG, Tom Too Dirección: 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, Estados Unidos de America Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense	
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2009/042102</u> Fecha <u>Abril 29, 2009</u> Publicación internacional No. <u>WO 2009/134878 A1</u> Fecha <u>Noviembre 5, 2009</u>			
6 Título (54) <u>COMPOSICIONES DE SWOLLENINA Y MÉTODOS DE INCREMENTAR LA EFICIENCIA DE UNA CELULASA</u>			
7 Clasificación internacional (51) <u>C12P 19/02 C12N 9/42</u>			
8 Prioridad ☒ SI ☐ NO		(33) País de Origen US	(32) Fecha Abril 29, 2008
		(31) Número de Solicitud 61/048.807	
9 Comprobante de pago No. _____ Fecha _____			

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros **Publicación Internacional**

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE JERÓNIMO CASTILLO BONILLA

FIRMA

C.C. 79.462.057 Bogotá

TP 104167

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(Continuación Inventores)

Nombre : MITCHINSON, Colin
Dirección : 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, Estados
Unidos de América
Nacionalidad : Estadounidense

Nombre : SALA, Rafael F.
Dirección : 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, Estados
Unidos de América
Nacionalidad : Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-132157- -00000-0000

Fecha: 2010-10-25 16:29:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL-DE CAJA : 10 - 89,417
FECHA : OCTUBRE 22 DE 2010

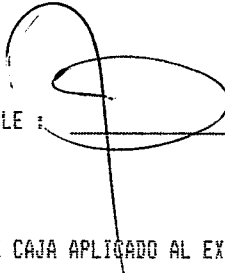
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO PINEDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383672391	22/10/2010	2,212,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
TOTAL :			\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-132157-00000-0000

Fecha: 2010-10-25 16:29:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 89,420
FECHA : OCTUBRE 22 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO PINEDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383672391	22/10/2010	2,212,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
20	50005-01-01	SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL
			TOTAL : \$ 520,000.00

SON: QUINIENTOS VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

State of California

SECRETARY OF STATE

Requested for use in Colombia.

Not for use within the United States of America.

The purpose of the Apostille is to certify the authenticity of the signature of the official signing the document, the capacity in which the official signing the document has acted, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp

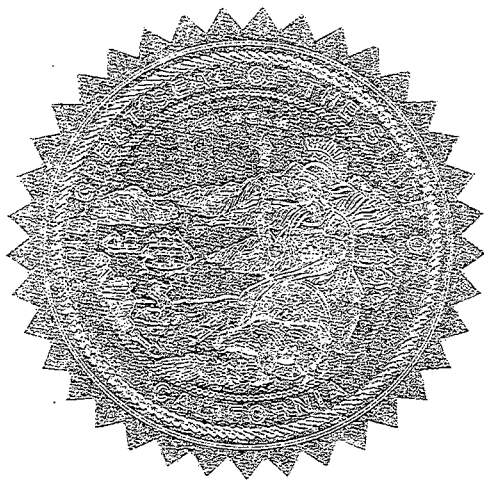
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Carol A. See*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Carol A. See, Notary Public.*
State of California
5. *At Sacramento California*
6. *the 1st day of September 2009*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 723031*
9. *Seal/Stamp:*

CERTIFIED

10. Signature



Jenna Bowen
Secretary of State

BY *[Signature]*



LAW OFFICES
PEDRO CASTILLO PINEDA &
ASSOCIATES
P.O. BOX 48362
Bogotá, Colombia / South America

IMPORTANT NOTE
The lodging of this GENERAL POWER with the Patent Office obviates the need of presenting special powers with each individual trade mark application.

FOR PATENTS AND TRADE MARKS IN
COLOMBIA

Poder General

General Power of Attorney

1 Applicant's (1)
name

(1) Danisco US Inc.

2 Applicant's domiciliado en (2)
address

domiciled in (2)
925 Page Mill Road, Palo Alto
California 94304
U.S.A.

3 Date
4 Applicant's
signature

nombra al Dr. JERONIMO CASTILLO BONILLA y/o Dra. XIMENA BONILLA PEREIRA y/o Dr. ALVARO CASTILLO GRAU Calle 93A N° 14-17 Oficina 311 en Bogotá, Colombia, como sus representantes con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Modelos y de Dibujos Industriales, de Nombres Comerciales y Enseñas, Lemas Comerciales y Denominaciones de Origen, lo mismo que trasposos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, cancelación de Registros de marca, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares; solicitar la nulidad de Patentes de Invención, modelos de utilidad, diseños industriales, así como la de registros de marcas ante la autoridad nacional competente; aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos, cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir y tomar en fin todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones y/o observaciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades necesarias, así como iniciar y tramitar procesos jurisdiccionales y/o administrativos relativos a competencia desleal. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, conciliar, renunciar, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

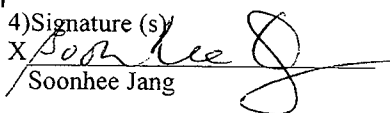
Dado y firmado en (3)

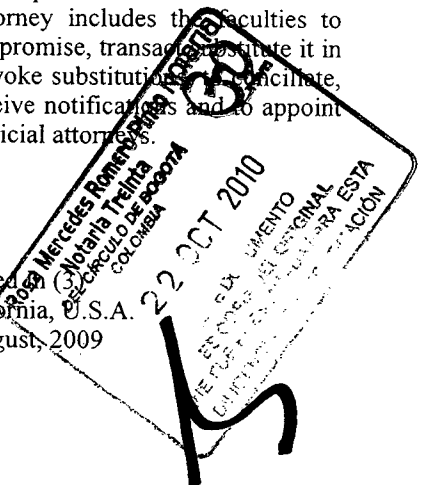
hereby appoint, JERONIMO CASTILLO BONILLA and/or XIMENA BONILLA PEREIRA and/or ALVARO CASTILLO GRAU, Calle 93A N° 14-17 Office 311 en Bogotá, Colombia, as our representatives with special, ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Privileged Patents of invention, Registration of Trade Marks, of Models and Industrial Drawings, of Commercial Names and ensigns, Commercial slogans and Origin Denominations as well as assignments, extensions, renewals, changes of name, registration of license of exploitation and of license of use referred to said actions, Cancellation Actions against trademark Registrations, who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals, and claims, apply for precautionary measures; apply for the nullity of Patent Inventions, Utility Models, Industrial Designs, as well as for Trademark Registrations before the competent national authority; to accept on our behalf and representation the assignment of rights of inventions and titles of invention that may be done to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquittance or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case that oppositions and/or observations are presented to intervene as complainant and defendant, with all necessary legal faculties, as well as to file jurisdictional processes and/or administrative related to disloyal competition.

This power of attorney includes the faculties to receive, desist, compromise, transact, substitute it in all or in part, to revoke substitution, to conciliate, to renounce, to receive notifications and to appoint extra-judicial or judicial attorney.

Given and signed in
Palo Alto, California, U.S.A.

22th day of August, 2009

4) Signature (s)
X 
Soonhee Jang



DECLARACION NOTARIAL
(Individual)

A los días del mes de
 compareció y/o comparecieron

personalmente ante mi, Notario Público

quien (es) doy fe de conocer y me consta que es
(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s) del
documento que precede, declarando ante mi que
otorga(n) el mismo para los fines y propósitos que
en él se expresan.

Notario Público,

NOTARIAL CERTIFICATE
(Individual)

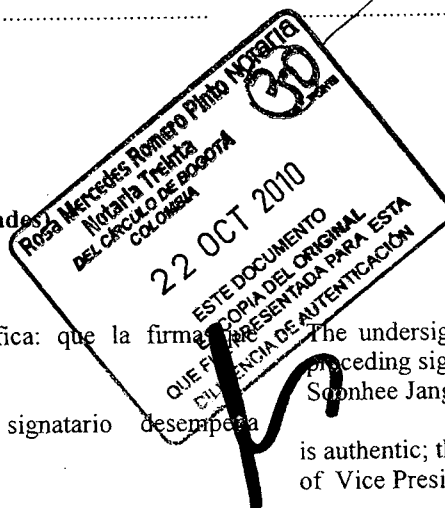
On this day of of
 personally appeared before me

a Notary Public

to me known, and known to me to be the
person(s) described in and who executed the
foregoing document, and he (they) duly
acknowledged to me that he (they) executed
same for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public.

(Sociedades)



(Corporations)

El suscrito Notario Certifica: que la firma
antecede y dice

es auténtica; que el signatario desempeña
actualmente el cargo de

de,

que tiene facultad para otorgar este poder; y que
dicha compañía esta domiciliada en

y actualmente existe y esta organizada de acuerdo
a las leyes de

Todos los hechos anteriores le constan por haber
examinado los documentos respectivos y de todo
ello da fe.

Dado y firmado en

El Notario Público,

(Con legalización Consular)

The undersigned Notary Public certifies: that the
preceding signature reading
Soonhee Jang

is authentic; that the signer at present fills the post
of Vice President, IP Strategy & Chief IP Counsel

of Danisco US Inc.

and that she is empowered to grant this power; and
that said company is domiciled in
Palo Alto, California, U.S.A.

and actually exists and is organized in accordance
with the laws of Delaware, USA

All the foregoing facts are known to the Notary
due to her having examined the respective
documents to which she, the Notary attests..

Given and signed in Palo Alto, California, USA
Carol A. See, Notary Public

Carol A. See

Notary Public.

(With Consular legalization)

IN WITNESS WHEREOF I undersign as follows:

Date: August 27, 2009

Soonhee Jang
Soonhee Jang,
Vice President, IP Strategy &
Chief IP Counsel

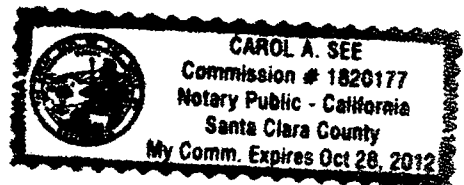
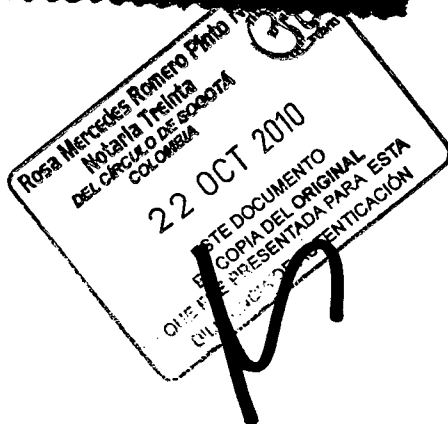
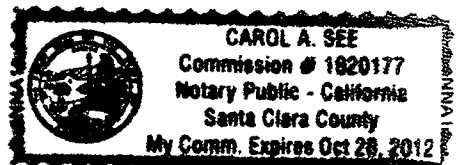
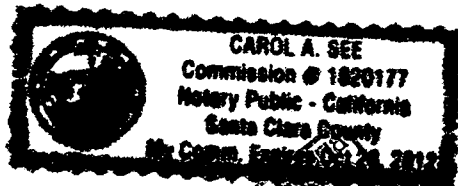
STATE OF CALIFORNIA
COUNTY OF SANTA CLARA

On 8/27/09, before me, Carol A. See, Notary Public, personally appeared, Soonhee Jang, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument. I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature Carol A. See

(Seal)



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 November 2009 (05.11.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/134878 A1

(51) International Patent Classification:

C12P 19/02 (2006.01) C07K 14/37 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2009/042102

(22) International Filing Date:

29 April 2009 (29.04.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/048,807 29 April 2008 (29.04.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **DANISCO US INC.** [US/US]; 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **HUANG, Tom, Tao** [US/US]; Danisco US Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304 (US). **MITCHINSON, Colin** [GB/US]; Danisco US Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304 (US). **SALA, Rafael, F.** [CA/US]; Danisco US Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304 (US).

(74) Agent: **TODD, Stephen**; Danisco US Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: SWOLLENIN COMPOSITIONS AND METHODS OF INCREASING THE EFFICIENCY OF A CELLULASE

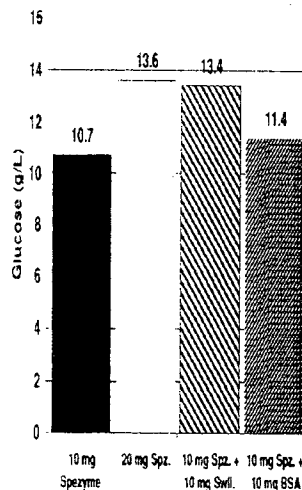


FIGURE 1

(57) Abstract: Described are compositions and methods relating to enhancing the efficiency of cellulases for sugar production from cellulosic biomass using the polypeptide swollenin.

WO 2009/134878 A1

SWOLLENIN COMPOSITIONS AND METHODS OF INCREASING THE EFFICIENCY OF A CELLULASE

PRIORITY

[001] The present application claims priority to U.S. Provisional Application Serial. No. 61/048,807, filed on April 29, 2008, which is hereby incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[002] The compositions and methods relate to enhancing the efficiency of a cellulase in producing sugars from cellulosic biomass using the polypeptide swollenin.

BACKGROUND

[003] Interest in ethanol as a renewable fuel is stronger than ever before. The use of ethanol as a fuel additive has grown over the past few years and is expected to continue to grow in the foreseeable future. The use of ethanol reduces dependence on foreign oil, lowers greenhouse gas emissions, provides economic benefits for rural communities, and establishes a foundation for a biobased economy.

[004] Potential feedstocks for cellulosic ethanol include corn stover, wheat straw, sugar cane bagasse, rice straw, paper pulp, wood chips, and biomass from "energy crops" such as fast-growing trees and grasses (switchgrass, prairie grass, miscanthus), dramatically expanding the available material for ethanol production. Although cellulosic biomass is available in large quantities, the main challenge for commercialization is to reduce the costs of an integrated biorefinery process that ultimately produced ethanol. Unlike starch, which contains homogenous and easily hydrolyzed polymers, typical cellulosic substrates/feedstocks for use in producing ethanol are not homogenous in nature. In addition to containing convertible cellulose and hemicellulose, they also contain lignin and other components, which cannot readily be converted to fermentable sugars.

[005] Typically, raw biomass must be extensively pretreated chemically, physically, or biologically to produce a suitable substrate/feedstock for ethanol production. Physical pretreatment techniques include one or more of various types of milling, crushing, irradiation, steaming/steam explosion, and hydrothermolysis. Chemical pretreatment techniques include acid, alkaline, organic solvent, ammonia, sulfur dioxide, carbon dioxide, and pH-controlled hydrothermolysis.

[006] There remains an urgent need to decrease the amount of hydrolytic enzyme necessary to convert the biomass to fermentable sugar and/or to decrease the amount of pretreatment necessary to make the biomass accessible to the hydrolytic enzymes.

SUMMARY

[007] In one aspect, a method for increasing the efficiency of a cellulase is provided, the method comprising (a) combining a cellulosic substrate, an amount of a whole cellulase and an amount of a swollenin and (b) incubating the cellulosic substrate, mixed cellulase composition and swollenin under conditions conducive to hydrolysis of cellulose. In a preferred implementation, the cellulosic substrate includes hydrogen-bonded molecules. The cellulosic substrate may be selected from the group consisting of wood, wood pulp, papermaking sludge, paper pulp waste streams, particle board, corn stover, corn fiber, rice, paper and pulp processing waste, woody or herbaceous plants, grasses, rice hulls, cottonstraw, corn cobs, distillers grains, leaves, wheat straw, coconut hair, switchgrass, and mixtures thereof.

[008] In a related aspect, a method for increasing the efficiency of cellulose hydrolysis using a cellulase is provided, the method comprising: (a) combining a cellulosic substrate, a cellulase composition, and recombinant swollenin, and (b) incubating the cellulosic substrate, cellulase composition, and swollenin under conditions conducive to hydrolysis of cellulose, wherein the presence of recombinant swollenin increases the efficiency of cellulase hydrolysis by the cellulase composition compared to that obtained using a the cellulase composition in the absence of swollenin.

[009] In some embodiments, the cellulase composition is a whole cellulase composition. In some embodiments, the cellulase composition is a mixed cellulase composition. In some embodiments, the cellulase composition comprises an endoglucanase, a cellobiohydrolases, and a β -glucosidase.

[0010] In some embodiments, the cellulase composition comprises one or more primary cellulases. In some embodiments, the cellulase composition consists essentially of one or more primary cellulases. In particular embodiments, the primary cellulases are selected from CBH1, CBH2, EG1, EG2, and β -glucosidase.

[0011] In some embodiments, the method is performed in the absence of accessory enzymes other than swollenin.

[0012] In some embodiments, the method is performed in the absence of EG4 and CIP1. In some embodiments, the method is performed in the absence of recombinant EG4 or recombinant CIP1. In some embodiments, the method is performed in the absence of recombinant EG4 and recombinant CIP1.

[0013] In some embodiments, the ratio of cellulases in the cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 20:1 and about 1:5. In some embodiments, the ratio of cellulases in

the cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 10:1 and about 1:2. In some embodiments, the ratio of cellulases in the cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 5:1 and about 1:1.5.

[0014] In some embodiments, the swollenin and the cellulases are present in an approximately equal amount (wt:wt). Exemplary amounts of swollenin are from about 30% to about 70%, from about 40% to about 60%, and about 50%, of the enzymes used in the method (wt:wt).

[0015] In some embodiments, the cellulosic substrate is selected from the group consisting of wood, wood pulp, papermaking sludge, paper pulp waste streams, particle board, corn stover, corn fiber, rice, paper and pulp processing waste, woody or herbaceous plants, grasses, rice hulls, cottonstraw, corn cobs, distillers grains, leaves, wheat straw, coconut hair, switchgrass, and mixtures thereof. In some embodiments, the cellulosic substrate is a softwood. In some embodiments, the cellulosic substrate is high lignin substrate. In some embodiments, the cellulosic substrate has a kappa number of 80 or higher.

[0016] In some embodiments, the percent increase in cellulase efficiency is at least about 10%, at least about 15%, or even at least about 20%.

[0017] In another aspect, an enzyme composition is provided, comprising a mixed or whole cellulase composition and a swollenin. The ratio of mixed/whole cellulase to swollenin (wt:wt) may be between about 20:1 and about 1:5, inclusive. The ratio of mixed cellulase to swollenin (wt:wt) may further be between about 10:1 and about 1:2, inclusive. The ratio of mixed cellulase to swollenin (wt:wt) may even be between about 5:1 and about 1:1.5, inclusive.

[0018] In a related aspect, an enzyme composition is provided, comprising: (a) a mixed cellulase composition comprising an endoglucanase, a cellobiohydrolases, and a β -glucosidase, and (b) recombinant swollenin.

[0019] In some embodiments, the composition does not include EG4 or CIP1. In some embodiments, the composition does not include recombinant EG4 or recombinant CIP1. In some embodiments, the composition does not include recombinant EG4 and does not include recombinant CIP1.

[0020] In some embodiments, the mixed cellulase composition consists essentially of primary cellulases.

[0021] In another related aspect, an enzyme composition is provided, which consists essentially of: (a) a mixed cellulase composition comprising an endoglucanase, a cellobiohydrolases, and a β -glucosidase, and (b) recombinant swollenin.

[0022] In some embodiments, the ratio of cellulases in any of the mixed cellulase compositions to swollenin (wt:wt) is between about 20:1 and about 1:5. In some embodiments, the ratio of cellulases in any of the mixed cellulase compositions to swollenin (wt:wt) is between about 10:1 and about 1:2. The composition of any of claims 20-25, wherein the ratio of

cellulases in any of the mixed cellulase compositions to swollenin (wt:wt) is between about 5:1 and about 1:1.5. In some embodiments, the swollenin and the cellulases are present in an approximately equal amount (wt:wt).

[0023] In some embodiments, the amount of swollenin (wt:wt) in the composition replaces an approximately equal amount of cellulases (wt:wt) in the composition, with respect to cellulase efficiency on a cellulosic substrate.

[0024] These and other aspects of the compositions and methods will be apparent from the following description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0025] Figure 1 illustrates glucose production by a mixed cellulase composition in the presence and absence of swollenin.

[0026] Figures 2A and 2B illustrate the effect of swollenin on cellulose hydrolysis of various cellulosic substrates.

[0027] Figure 3 illustrates glucose production by 30 mg total enzyme per g cellulose with the enzyme being provided by various ratios of mixed cellulase to swollenin.

[0028] Figure 4 illustrates percent cellulose digestion of softwood pulp at different relative concentrations of mixed cellulase and swollenin.

DETAILED DESCRIPTION

I. Definitions

[0029] Prior to describing the present compositions and methods, the following terms and phrases are defined. Terms not defined should be accorded their ordinary meaning as used in the art.

[0030] As used herein, "swollenin" refers to a protein/polypeptide that has the ability to facilitate weakening of filter paper and cause the swelling of cotton fibers without having cellulolytic activity, *i.e.*, catalytic activity involving the breakage of individual cellulose strands into smaller monomer (glucose) or oligomers (polysaccharides). While it is useful to define swollenins loosely in terms of the expansin proteins described in McQueen-Mason *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:1425-33, it is also apparent that microbial swollenins have distinct properties, for example, microbial swollenins are much larger proteins than plant expansins and have a low level of sequence identity with plant expansins. Moreover, certain microbial swollenin proteins exist in conjunction with a cellulose binding domain and may further exist in conjunction with a catalytic cellulase domain.

[0031] As used herein, the term "cellulosic substrate" or "cellulosic feedstock" refers to materials which are composed of cellulose, hemi-cellulose, and β -glucans that are cross-linked with each other, and with lignin. Such cellulosic substrates may also contain other materials

such as pectins, proteins starch and lipids, but preferably will have cellulose, hemi-cellulose and β -glucans as primary components.

[0032] As used herein, the terms "purification" and "isolation," with reference to swollenin, refer to the separation of swollenin from some or all of the naturally occurring constituents with which it is associated in nature, or from some or all of the constituents with which it is associated following heterologous expression. The term "constituents" generally refers to other proteins, nucleic acids, lipids, cell wall material, and other cellular components.

[0033] As used herein, the term "kappa value" refers to the degree of lignification of a cellulosic substrate. Kappa values can be determined using, e.g., International Organization for Standardization document ISO 302:2004.

[0034] As used herein, the term "cellulose" refers a polysaccharide consisting of $\beta(1\rightarrow4)$ linked D-glucose units having the general formula $(C_6H_{10}O_5)_n$. Cellulose is the structural component of the primary cell wall of green plants, many forms of algae and the oomycetes.

[0035] As used herein, the term "cellulase" refers to an enzyme capable of hydrolyzing cellulose polymers to shorter oligomers and/or glucose.

[0036] As used herein, the term "whole cellulase composition/preparation/mixture" or the like refers to both naturally occurring and non-naturally occurring compositions that include a plurality of cellulases produced by an organism, for example a filamentous fungus. One example of a whole cellulase composition is medium (i.e., broth) in which filamentous fungi are cultured, which includes secreted cellulases, such as one or more cellobiohydrolases, one or more endoglucanases, and one or more β -glucosidases at a predetermined ratio.

[0037] As used herein, an "endoglucanase (EG)" is an enzyme (EC 3.2.1.4) that acts mainly on the amorphous parts of the cellulose fibre to hydrolyze internal β -1,4-glucosidic bonds in regions of low crystallinity.

[0038] As used herein, a "cellobiohydrolases (CBH)" or "exoglucanases" is an enzyme (EC 3.2.1.91) that hydrolyzes cellobiose from the reducing or non-reducing end of cellulose to degrade crystalline cellulose.

[0039] As used herein, a " β -glucosidase" or " β -D-glucoside glucohydrolase" is an enzyme (EC 3.2.1.21) that acts to liberate D-glucose units from cellobiose, cello-oligosaccharides, and other glucosides

[0040] As used herein, "hemicellulose" is a polymer component of plant materials that contains sugar monomers other than glucose, in contrast to cellulose, which contains only glucose. In addition to glucose, hemicellulose may include xylose, mannose, galactose, rhamnose, and arabinose, and the like, with xylose being the most common sugar monomer. Hemicelluloses contain most of the D-pentose sugars, and occasionally small amounts of L-sugars. The sugars in hemicellulose may be linked by ester linkages as well as glycosidic

linkages. Exemplary forms of hemicellulose include but are not limited to are galactan, mannan, xylan, araban, arabinoxylan, glucomannan, galactomanan, and the like.

[0041] As used herein, the term "hemicellulase" refers to a class of enzymes capable of breaking hemicellulose into its component sugars or shorter polymers, and includes endo-acting hydrolases, exo-acting hydrolases, and various esterases.

[0042] As used herein, a "primary cellulase" or "primary cellulolytic enzyme" is a cellulase that is required to efficiently hydrolyze cellulose or to produce glucose from a cellulosic substrate. Primary cellulases include CBH1, CBH2, EG1, EG2, and β -glucosidase.

[0043] As used herein, the term "accessory enzyme" refers to an enzyme that may be included in a cellulase composition to improve the efficiency of a cellulase (or combination of cellulases) but is not required for the efficient hydrolysis of cellulose or the production of glucose from a cellulosic substrate. Accessory enzymes include swollenin, EG4, cellulose induced protein (CIP1), and xylanase.

[0044] As used herein, a "naturally occurring" composition is one produced in nature or by an organism that occurs in nature.

[0045] As used herein, a "variant" protein differs from the "parent" protein from which it is derived by the substitution, deletion, or addition of a small number of amino acid residues, for example, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, or more amino acid residues. In some cases, the parent protein is a "wild-type," "native," or "naturally-occurring" polypeptides. Variant proteins may be described as having a certain percentage sequence identity with a parent protein, *e.g.*, at least 80%, at least 81%, at least 82%, at least 83%, at least 84%, at least 85%, at least 86%, at least 87%, at least 88%, at least 89%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, at even at least 99%, which can be determined using any suitable software program known in the art, for example those described in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel *et al.* (eds) (1987) Supplement 30, section 7.7.18). Preferred programs include the VECTOR NTI ADVANCE™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), GCG PILEUP program, FASTA (Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:2444–2448), and BLAST (BLAST Manual, Altschul *et al.*, Nat'l. Cent. Biotechnol. Inf., Nat'l Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., and Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402). Another preferred alignment program is ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA), preferably using default parameters. Another sequence software program that finds use is the TFASTA Data Searching Program available in the Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI).

[0046] The use of the singular includes the plural unless specifically stated otherwise, and the use of "or" means "and/or" unless stated otherwise. The terms "comprise," "comprising," "comprises," "include," "including," and "includes" are not intended to be limiting. The term

"consisting essentially of" means that other components or steps may optionally be present but are not essential to produce or bring about a described effect.

[0047] All patents and publications, including all amino acid and nucleotide sequences disclosed within such patents and publications, referred to herein are expressly incorporated by reference.

[0048] The following abbreviations/acronyms have the following meanings unless otherwise specified:

°C	degrees Centigrade
BSA	bovine serum albumin
CBD	carbohydrate-binding domain
cDNA	complementary DNA
CMC	carboxymethyl cellulose
CMC	carboxymethylcellulose
dH ₂ O or DI	deionized water
dH ₂ O	deionized water, Milli-Q filtration
DNA	deoxyribonucleic acid
ds or DS	dry solids content
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eq.	equivalent
ETOH	ethanol
g or gm	gram
GA	glucoamylase
Genencor	Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA, USA
H ₂ O	water
HPLC	high pressure/performance liquid chromatography
hr	hour
IPTG	isopropyl β-D-thiogalactoside
IU	international unit
kDa	kiloDalton
kg	kilogram
L	liter
M	molar
mg	milligram
min and '	minute
mL and ml	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolar
MW	molecular weight
N	normal
PCS	pretreated corn stover
PEG	polyethyleneglycol
pI	isoelectric point
pNPG	p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside
RNA	ribonucleic acid
RPM	revolutions per minute
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
sec and "	second
sp./spp.	species (singular/plural)
Spz.	SPEZYME
U	unit

UFC	ultra-filtered concentrate
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight
wt%	weight-percent
µg	microgram
µL and µl	microliter
µm	micrometer
µM	micromolar

II. The use of swollenin to enhancing the sugar yield from cellulosic feedstocks

[0049] An aspect of the compositions and methods relates to enhancing the sugar yield from cellulosic feedstocks/substrates by supplementing a cellulase composition with swollenin. In one aspect, a method for enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulose is provided, the method comprising: (a) combining a cellulosic substrate, a mixed cellulase composition and swollenin; and (b) incubating the cellulosic substrate, mixed cellulase composition and swollenin under conditions conducive to hydrolyze cellulose. The compositions and methods are based on the surprising observation that replacement of up to 50% of a mixed cellulase composition with a swollenin can substantially enhance the amount of fermentable sugar generated from a cellulosic substrate.

[0050] A variety of proteins, called "expansins" have been identified in a variety of food plants. These expansins are believed to enhance osmotic uptake of water, which is the driving force of plant cell expansion. As water enters the cell, the protoplast expands but is restrained by the cell wall, which is held together by a rigid complex of cellulose microfibril polymers embedded in a glue-like matrix of pectins, hemicelluloses and proteins. The expansin family of proteins, found in various fruits, vegetables, grains, and oats, function as such a "wall loosening" factor, which alters the mechanical properties immature cell wall and allows it to undergo a process of elongation (see, e.g., Shcherban *et al.* (1995) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9245-49; Wang *et al.* (1994) *Biotech. Lett.* 16:955-58; Keller *et al.* (1995) *The Plant Journal* 8:795-802; Li *et al.* (1993) *Planta*, Vol. 191, pp. 349-56). Expansins play an important role in plant cell growth, fruit softening, abscission, emergence of root hairs, pollen tube invasion of the stigma and style, meristem function, and other developmental processes where cell wall loosening occurs.

[0051] More recently, expansin-like enzymes have been identified from microbial hosts. Once such enzyme, called swollenin, derived from *Trichoderma reesei*, is described in U.S. Patent No. 6,458,928 (incorporated herein by reference). The sequence of swollenin partly resembles plant expansins, which are thought to break hydrogen bonds between polysaccharides in a cell wall. The native polypeptide sequence, including the N-terminal signal peptide, is shown as i.e., SEQ ID NO: 1. The mature polypeptide sequence is shown as SEQ ID NO: 2. Unlike expansins, mature swollenin includes at its N-terminus a cellulose-binding

domain (CBD) that is linked via a linker region to an expansin-like domain. A CBD of this kind also occurs in well-known *T. reesei* cellulases, such as CBH I and EG II. Unlike swollenin cellulases are hydrolytic, at least to some extent.

MetAlaGlyLysLeuIleLeuValAlaLeuAlaSerLeuValSerLeuSerIleGlnGln
AsnCysAlaAlaLeuPheGlyGlnCysGlyGlyIleGlyTrpSerGlyThrThrCysCys
ValAlaGlyAlaGlnCysSerPheValAsnAspTrpTyrSerGlnCysLeuAlaSerThr
GlyGlyAsnProProAsnGlyThrThrSerSerSerLeuValSerArgThrSerSerAla
SerSerSerValGlySerSerSerProGlyGlyAsnSerProThrGlySerAlaSerThr
TyrThrThrThrAspThrAlaThrValAlaProHisSerGlnSerProTyrProSerIle
AlaAlaSerSerCysGlySerTrpThrLeuValAspAsnValCysCysProSerTyrCys
AlaAsnAspAspThrSerGluSerCysSerGlyCysGlyThrCysThrThrProProSer
AlaAspCysLysSerGlyThrMetTyrProGluValHisHisValSerSerAsnGluSer
TrpHisTyrSerArgSerThrHisPheGlyLeuThrSerGlyGlyAlaCysGlyPheGly
LeuTyrGlyLeuCysThrLysGlySerValThrAlaSerTrpThrAspProMetLeuGly
AlaThrCysAspAlaPheCysThrAlaTyrProLeuLeuCysLysAspProThrGlyThr
ThrLeuArgGlyAsnPheAlaAlaProAsnGlyAspTyrTyrThrGlnPheTrpSerSer
LeuProGlyAlaLeuAspAsnTyrLeuSerCysGlyGluCysIleGluLeuIleGlnThr
LysProAspGlyThrAspTyrAlaValGlyGluAlaGlyTyrThrAspProIleThrLeu
GluIleValAspSerCysProCysSerAlaAsnSerLysTrpCysCysGlyProGlyAla
AspHisCysGlyGluIleAspPheLysTyrGlyCysProLeuProAlaAspSerIleHis
LeuAspLeuSerAspIleAlaMetGlyArgLeuGlnGlyAsnGlySerLeuThrAsnGly
ValIleProThrArgTyrArgArgValGlnCysProLysValGlyAsnAlaTyrIleTrp
LeuArgAsnGlyGlyGlyProTyrTyrPheAlaLeuThrAlaValAsnThrAsnGlyPro
GlySerValThrLysIleGluIleLysGlyAlaAspThrAspAsnTrpValAlaLeuVal
HisAspProAsnTyrThrSerSerArgProGlnGluArgTyrGlySerTrpValIlePro
GlnGlySerGlyProPheAsnLeuProValGlyIleArgLeuThrSerProThrGlyGlu
GlnIleValAsnGluGlnAlaIleLysThrPheThrProProAlaThrGlyAspProAsn
PheTyrTyrIleAspIleGlyValGlnPheSerGlnAsn (SEQ ID NO: 1)

GlnGlnAsnCysAlaAlaLeuPheGlyGlnCysGlyGlyIleGlyTrpSerGlyThrThr
CysCysValAlaGlyAlaGlnCysSerPheValAsnAspTrpTyrSerGlnCysLeuAla
SerThrGlyGlyAsnProProAsnGlyThrThrSerSerSerLeuValSerArgThrSer
SerAlaSerSerSerValGlySerSerSerProGlyGlyAsnSerProThrGlySerAla
SerThrTyrThrThrThrAspThrAlaThrValAlaProHisSerGlnSerProTyrPro
SerIleAlaAlaSerSerCysGlySerTrpThrLeuValAspAsnValCysCysProSer
TyrCysAlaAsnAspAspThrSerGluSerCysSerGlyCysGlyThrCysThrThrPro
ProSerAlaAspCysLysSerGlyThrMetTyrProGluValHisHisValSerSerAsn
GluSerTrpHisTyrSerArgSerThrHisPheGlyLeuThrSerGlyGlyAlaCysGly
PheGlyLeuTyrGlyLeuCysThrLysGlySerValThrAlaSerTrpThrAspProMet
LeuGlyAlaThrCysAspAlaPheCysThrAlaTyrProLeuLeuCysLysAspProThr
GlyThrThrLeuArgGlyAsnPheAlaAlaProAsnGlyAspTyrTyrThrGlnPheTrp

SerSerLeuProGlyAlaLeuAspAsnTyrLeuSerCysGlyGluCysIleGluLeuIle
 GlnThrLysProAspGlyThrAspTyrAlaValGlyGluAlaGlyTyrThrAspProIle
 ThrLeuGluIleValAspSerCysProCysSerAlaAsnSerLysTrpCysCysGlyPro
 GlyAlaAspHisCysGlyGluIleAspPheLysTyrGlyCysProLeuProAlaAspSer
 IleHisLeuAspLeuSerAspIleAlaMetGlyArgLeuGlnGlyAsnGlySerLeuThr
 AsnGlyValIleProThrArgTyrArgArgValGlnCysProLysValGlyAsnAlaTyr
 IleTrpLeuArgAsnGlyGlyGlyProTyrTyrPheAlaLeuThrAlaValAsnThrAsn
 GlyProGlySerValThrLysIleGluIleLysGlyAlaAspThrAspAsnTrpValAla
 LeuValHisAspProAsnTyrThrSerSerArgProGlnGluArgTyrGlySerTrpVal
 IleProGlnGlySerGlyProPheAsnLeuProValGlyIleArgLeuThrSerProThr
 GlyGluGlnIleValAsnGluGlnAlaIleLysThrPheThrProProAlaThrGlyAsp
 ProAsnPheTyrTyrIleAspIleGlyValGlnPheSerGlnAsn (SEQ ID NO: 2)

[0052] In some embodiments, the swollenin is a naturally-occurring variant *T. reesei* swollenin that has at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or even at least 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. In some embodiments, the swollenin is obtained from a different organism, and has at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or even at least 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

[0053] In further embodiments, the swollenin is an engineered variant swollenin, that includes at least one substitution, insertion, or deletion that imparts an advantageous feature to the swollenin, and wherein the remainder of the amino acid sequence (*i.e.*, not including the one or more substitutions, insertions, or deletions) has at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or even at least 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. The substitution, insertion, or deletion may be in the N-terminal CBD, thereby affecting cellulose binding, or in a portion of the polypeptide other than the CBD, thereby affecting, *e.g.*, the disruption of hydrogen bonds in a cellulosic substrate. In related embodiments, the swollenin is fragment or domain of swollenin that retain the biological activity described herein. In particular embodiments, the fragment lacks the CBD.

[0054] Suitable cellulosic substrates for use with swollenin include wood, wood pulp, papermaking sludge, paper pulp waste streams, particle board, corn stover, corn fiber, rice, paper and pulp processing waste, woody or herbaceous plants, grasses, rice hulls, cottonstraw, corn cobs, distillers grains, leaves, wheat straw, coconut hair, switchgrass, and mixtures thereof. An aspect of the present compositions and methods is the discovery that addition of swollenin to cellulase enhances sugar production in woody and herbaceous substrates. On the

other hand, swollenin is not believed to be advantageous for use with grain-based or fruit-based substrates. Generally, due to swollenin's ability to interrupt hydrogen bonding, any substrate in which hydrogen bonding is prevalent (e.g., crystalline cellulose) are likely to be susceptible to swollenin activity, and are therefore suitable substrates. Exemplary cellulosic substrates have a high lignin content, as in the case of, e.g., softwoods. In some cases, the cellulosic substrate has a kappa number of 80 or higher, for example, 80, 81, 82, or higher.

[0055] The cellulosic substrate can be used directly (*i.e.*, without pretreatment), or may be subjected to pretreatment using conventional methods that are known in the art. Exemplary pretreatments are chemical, physical, and biological pretreatments. Physical pretreatment techniques include, without limitation, various types of milling, crushing, steaming/steam explosion, irradiation, and hydrothermolysis. Chemical pretreatment techniques include, without limitation, dilute acid, alkaline, organic solvent, ammonia, sulfur dioxide, carbon dioxide, and pH-controlled hydrothermolysis. Biological pretreatment techniques include, without limitation, applying lignin-solubilizing microorganisms to the substrate.

[0056] The enzymatic hydrolysis of cellulose is preferably carried out at a temperature in a range of about 45°C to about 75°C, and a pH of from about 3.5 to about 7.5. The initial concentration of cellulose in the hydrolysis reactor, prior to the start of hydrolysis, is preferably from about 4% (w/w) to about 15% (w/w). The combined dosage of all primary cellulase enzymes may be from about 5 to about 45 mg protein per gram cellulose. The hydrolysis may be carried out for a time period of from about 12 hours to about 200 hours. Preferably, the hydrolysis is carried out for a period of 15 hours to 100 hours. It should be appreciated that the reaction conditions are not meant to limit the invention in any manner and may be adjusted as desired by those of skill in the art.

[0057] The hydrolysis process preferably converts about 80% to about 100% of the cellulose to soluble sugars, or any range between. More preferably, the enzymatic hydrolysis process converts from about 90% to about 100% of the cellulose to soluble sugars, or even from about 98% to about 100% of the cellulose to soluble sugars.

[0058] The hydrolysis using the mixed cellulase composition and swollenin may be batch hydrolysis, continuous hydrolysis, or a combination thereof. The hydrolysis may be agitated, unimixed, or a combination thereof. The hydrolysis is typically carried out in a hydrolysis reactor. The primary cellulase and swollenin enzymes are added to the pretreated cellulosic feedstock (also referred to as the "substrate") prior to, during, or after the addition of the substrate to the hydrolysis reactor. The cellulase and swollenin can be added simultaneously or sequentially to the hydrolysis. Over the extended period of hydrolysis additional cellulase and/or swollenin added to the partially digested cellulosic substrate.

[0059] Swollenin may be isolated from a microbial strain that produces it naturally, but preferably it is produced by a genetically modified organism, wherein a gene coding swollenin

or an active fragment thereof, is operatively linked to a strong promoter for overexpressing the protein. The resultant gene construct (i.e., nucleic acid sequence), including at least part of the gene encoding swollenin, is used to transform a heterologous or homologous host cell, which is subsequently cultivated under conditions to express the desired protein is expressed.

Recombinant protein expression methods are known in the art. Suitable host cells include, for instance, filamentous fungi, such as *Trichoderma* spp. or *Aspergillus* spp., and yeast. A preferred mode for preparing swollenin is via transformation of a *Trichoderma* spp. host cell with a DNA construct comprising at least a fragment of DNA encoding a portion or all of the swollenin that is functionally attached to a promoter. The transformed host cell is then grown under conditions so as to express the desired protein.

[0060] Swollenin is preferably produced as an extracellular protein that is secreted into culture medium, which may be used as a source of swollenin directly (e.g., as a broth), or used to further isolated and/or purified swollenin using methods known in the protein art.

Alternatively, where swollenin is expressed as an intracellular protein, the cells are disrupted, followed by isolation and/or purification of the intracellular swollenin.

[0061] Where it is desired to obtain the swollenin protein in the absence of cellulolytic activity, it is useful to obtain, for example, a *Trichoderma* host cell strain which has had one or more cellulase genes deleted prior to introduction of a DNA construct or plasmid containing the DNA fragment encoding the swollenin. Such strains may be prepared by the method disclosed in U.S. Patent No. 5,246,853 and WO 92/06209, which disclosures are hereby incorporated by reference. By expressing a swollenin in a host microorganism that is missing one or more cellulase genes, the identification and subsequent purification procedures are simplified. However, for use in the present invention, it is not necessary to completely exclude cellulolytic enzymes from the purified swollenin.

[0062] In particular embodiments, swollenin or a derivative, thereof, is recovered in active form from the host cell after growth in liquid media. The swollenin may include appropriate post-translational processing. The expressed swollenin can be recovered from the medium by conventional techniques including separations of the cells from the medium by centrifugation, filtration, and precipitation of the proteins in the supernatant or filtrate with a salt, for example, ammonium sulfate. Alternatively or additionally, chromatographic procedures such as ion exchange chromatography or affinity chromatography may be used. Antibodies (polyclonal or monoclonal) may be raised against purified swollenin, fragments of purified swollenin, or synthetic peptides corresponding to portions of swollenin.

[0063] In some embodiments, swollenin proteins are isolated or purified from other components with which it is naturally associated or other component of cells used to express the swollenin. A purified swollenin need not be devoid of all other components, but has a higher ratio of swollenin to extraneous proteins (and/or other components) than that found in

the natural state, in culture medium, or in lysed cells. Purification can be accomplished by recognized separation techniques, such as ion exchange chromatography, affinity chromatography, hydrophobic separation, dialysis, protease treatment, ammonium sulfate or other salt precipitation, centrifugation, size exclusion chromatography, filtration, microfiltration, gel electrophoresis, or separation on a gradient to remove whole cells, cell debris, impurities, extraneous proteins (including enzymes) that are undesired in the final composition. It is further possible to then add components to a swollenin containing composition, which provide additional benefits, for example, activating agents, anti-inhibition agents, ions, compounds to control pH, or other enzymes, such as cellulase.

[0064] The amount of swollenin added to a hydrolytic mixture may vary in accordance with the biomass to be treated but is typically about 0.1 to about 30 mg/g of cellulose, preferably about 2 mg/g to about 20 mg/g of cellulose, and even about 5 mg/g to about 15 mg/g of cellulose. Alternatively, the amount of swollenin used in the present invention can be determined based on the total cellulosic substrate or total raw or pretreated biomass. The swollenin treatment is carried out at about 20 to about 80 °C, preferably at about 30 to about 50 °C, at a pH range of about 3 to about 10, preferably about 4 to about 6, for about 0.1 to about 24 hours, preferably about 2 to about 6 hours, at about 1% to about 30% solids (dry) loading, preferably about 15% to about 25%.

[0065] Typically, the enzymes will be used in a ratio of about 5:1 to about 1:5 cellulase:swollenin. More preferably, the enzymes are used in a ratio of about 2:1 to about 1:2 cellulase:swollenin. The relative ratio of enzyme can vary depending upon the type of cellulosic substrate. In some cases, swollenin represents an approximately equal amount of enzyme in a composition for treating a cellulosic material, as compared to the amount of cellulase in the composition. An approximately equal amount means that about 40-60% of the enzymes are swollenin, e.g., approximately 50%. A microcrystalline cellulosic substrate (*i.e.*, softwood pulp) rich in hydrogen bonding may require more swollenin than for an amorphous substrate (*i.e.*, phosphoric acid swollen cellulose) with relatively lower degree of hydrogen bonding.

[0066] A mixed cellulase composition for use as described may have three synergistic cellulolytic activities: endo-1,4- β -D-glucanase, exo-1,4- β -glucosidase, and β -D-glucosidase activities. Each of these activities may be provided by one or more cellulase enzymes, which represent the primary cellulases (and activities, thereof) in the present compositions and methods. Any cellulase enzyme in the mixed cellulase composition can provide one or more of the three cellulolytic activities. Exemplary primary cellulases include CHB1, CBH2, EG1, EG2, and β -glucosidase. The cellulase composition may be an aqueous solution protein in water, a slurry of protein in water, a solid powder or granule, or a gel. A blend comprising cellulase enzymes may include additives, such as buffers, detergents, stabilizers, fillers, or other such additives familiar to those skilled in the art.

[0067] In some embodiments, the present compositions and method do not require an additional accessory enzyme (*i.e.*, other than swollenin) in combination with a primary cellulase or combination of cellulases, as may be found in a whole cellulase broth. Such addition accessory enzymes include EG4, CIP1, and xylanase. Thus, in certain embodiments the present compositions and methods consist essentially of swollenin and one or more primary cellulases in the absence of accessory enzymes such as EG4, CIP1, and/or xylanase. In particular embodiments, the compositions and methods consist essentially of swollenin and one or more primary cellulases in the absence of EG4 or CIP1. In a more particular embodiment, the compositions and methods consist essentially of swollenin and one or more primary cellulases in the absence of EG4 and CIP1.

[0068] The cellulase and/or swollenin may be derived from microbial origins, and particularly from fungal or bacterial origins. Microorganisms that possess cellulolytic capabilities may be sources of both cellulase and swollenin proteins. In some embodiments, the cellulase and/or swollenin is derived from *Trichoderma* spp., particularly *Trichoderma reesei* (*longibrachiatum*). However, the cellulase and/or swollenin may also be derived from a fungus, such as *Absidia* spp.; *Acremonium* spp.; *Agaricus* spp.; *Anaeromyces* spp.; *Aspergillus* spp., including *A. auculeatus*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. fumaricus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus* and *A. versicolor*; *Aeurobasidium* spp.; *Cepha/osporum* spp.; *Chaetomium* spp.; *Chrysosporium* spp.; *Coprinus* spp.; *Dactyllum* spp.; *Fusarium* spp., including *F. conglomerans*, *F. decemcellulare*, *F. javanicum*, *F. lini*, *Foxysporum* and *F. solani*; *Gliocladium* spp.; *Humicola* spp., including *H. insolens* and *H. lanuginosa*; *Mucor* spp.; *Neurospora* spp., including *N. crassa* and *N. sitophila*; *Neocallimastix* spp.; *Orpinomyces* spp.; *Penicillium* spp.; *Phanerochaete* spp.; *Phlebia* spp.; *Piromyces* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Rhizopus* spp.; *Schizophyllum* spp.; *Trametes* spp.; *Trichoderma* spp., including *T. reesei*, *T. reesei* (*longibrachiatum*) and *T. viride*; and *Zygorhynchus* spp. Similarly, it is envisioned that swollenin and/or DNA encoding swollenin may be found in cellulolytic bacteria such as *Bacillus* spp.; *Cellulomonas* spp.; *Clostridium* spp.; *Myceliophthora* spp.; *Thermomonospora* spp.; *Streptomyces* spp., including *S. olivochromogenes*; specifically fiber degrading ruminal bacteria such as *Fibrobacter succinogenes*; and in yeast including *Candida torresii*; *C. parapsilosis*; *C. sake*; *C. zeylanoides*; *Pichia minuta*; *Rhodotorula glutinis*; *R. mucilaginosa*; and *Sporobolomyces ho/saticus*.

[0069] Aspects of the present compositions and methods may be further understood in light of the following examples, which should not be construed as limiting. Modifications to materials and methods will be apparent to those skilled in the art.

EXAMPLES

[0070] The following examples are provided to illustrate the compositions and methods.

Example 1: Evaluation of swollenin on softwood pulp

[0071] Softwood pulp equivalent to 0.1 g of cellulose was added to a 20 mL glass scintillation vial for each test. Each vial is brought to total volume of 10 mL, minus the amount of enzyme to be added in each test, by the additional of distilled water. The contents of each vial were brought to 50 °C by warming in the incubator set at 50 ° ± 1 °C. To each vial 1 or 2 mg a whole cellulase composition obtained from *Trichoderma* (i.e., SPEZYME® CP, specific activity = 3200-4110 IU/g; Genencor International, Inc., Palo Alto, CA, USA,) was added to a final cellulase concentration of 10 mg cellulase per g cellulose or 20 mg cellulase per g cellulose (as described in Table 1). Purified swollenin or Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma), as a control, was added to a final concentration of 10 mg/g cellulose (Table 1). Swollenin was prepared, purified and characterized according to the procedure described by Saloheimo *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4202-11 (see Example 5, *infra*). The concentration of swollenin protein was estimated by gel electrophoresis and was approximately 3 mg/ml in both preparations.

[0072] The vials were closed and incubated with gentle rotation (180 RPM) at 50 °C for a period of 24 hours. An aliquot was taken for analysis. Solids were removed by centrifugation. The supernatant was subjected to glucose analysis using either a YSI glucose analyzer or a Waters Alliance HPLC system. The results are shown in Table 1 and Figure 1. Cellulase when supplemented with swollenin increased glucose concentration for both softwood and PCS substrates in 24 hr. Under the same total protein loading conditions (20 mg), 10 mg swollenin was essentially capable of replacing 10 mg cellulase. The control protein (BSA) did not produce the same effect.

TABLE 1

Enzyme (/g cellulose)	Glucose (g/L)	
	softwood	PCS 7.2%
10 mg cellulase	10.7	46
20 mg cellulase	13.6	51.9
10 mg cellulase + 10 mg swollenin	13.4	49
10 mg cellulase + 10 mg bovine serum albumin	11.4	45.5

Example 2: Substrate selectivity of swollenin

[0073] Carboxymethyl cellulose (CMC), 1%; solka Floc (a synthetic, pure microcrystalline cellulose), 1%; softwood (kappa value = 0); softwood (kappa value = 82); mixed hardwood (kappa = 81); softwood (kappa = 80); and waste pulp (kappa = 60); were tested for enhanced glucose production upon addition of swollenin. Each cellulosic substrate in an amount equivalent to 0.1 g of cellulose was added to a 20 mL glass scintillation vial for each test. 5.0 mL of a solution containing 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.8), 40 μ L (400 μ g) tetracycline, and 30 μ L (300 μ g) cycloheximide was added to each vial. Each vial was brought to total volume of 10 mL, minus the amount of enzyme to be added in each test, by the additional of distilled water. The contents of each vial were brought to 50°C by warming in an incubator set at 50° $\pm$ 1°C. To each vial a whole cellulase composition obtained from *Trichoderma* (i.e., SPEZYME® CP, specific activity = 3200-4110 IU/g; Genencor International, Inc., Palo Alto, CA, USA,) was added to a final cellulase concentration of 20 mg cellulase per g cellulose. Additionally, β -glucosidase was added to a final concentration of 64 pNPG U/g cellulose.

[0074] Semi-purified swollenin was added to a final concentration of 10 mg/g cellulose (referring to Table 1). As before, swollenin was prepared, purified and characterized according to the procedure described by Saloheimo *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4202-11 (see Example 5, *infra*). The concentration of swollenin protein was estimated by gel electrophoresis and was approximately 2 mg/ml in both preparations.

[0075] The vials were closed and incubated with gentle rotation (180 RPM) at 50°C for a period of 24 hours. An aliquot was taken for analysis. Solids were removed by centrifugation. The supernatant was subjected to glucose analysis using a YSI glucose analyzer or a Waters Alliance HPLC system. The results are shown in Table 2 and in Figures 2A and 2B.

TABLE 2

Substrate	Kappa value	Glucose (g/L)	
		no swollenin	10 mg/g swollenin
CMC	0	1	1.1
Solka Floka	0	4.7	5.4
softwood	0	9.4	10.4
	82	2.4	5.1
	80	2.5	4.8
hardwood	81	5	6.65
waste pulp	60	4.75	5.3

[0076] Compared to synthetic substrate such as CMC or Solka Floka, a greater benefit from the presence swollenin was obtained using a cellulosic substrate such as softwood or hardwood pulp, as evidenced by the observation that more glucose sugar was liberated from the substrate. This effect is more pronounced in a high lignin substrate (e.g., softwood pulp, kappa value=82) than a zero lignin substrate (e.g., softwood pulp, kappa=0). Thus, the addition of swollenin may be more beneficial in the case of a highly recalcitrant substrate, e.g., where the substrate's pretreatment process has not been optimized, the lignin content is high, and/or the hydrogen bonds in the substrate are still intact and uninterrupted.

Example 3: Evaluation of swollenin on the hydrolytic performance of cellulase on softwood pulp

[0077] Unbleached softwood pulp with a kappa value of 82 was obtained from Smurft Facture (Biganos, FR). The unbleached pulp was derived through the Kraft process, washed and then air dried. Each sample was prepared to provide a final composition containing 4% cellulose (glucan) by dry weight in a 10 mL volume of reaction mixture. Enzymes were added to the sample substrate (as set forth in Table 2) in 20 mL scintillation vials to a total liquid volume of 10 mL, which included 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8) and antibiotics (tetracycline and cyclohexamide). A whole cellulase composition obtained from *Trichoderma* (i.e., SPEZYME® CP, Genencor International, Inc., Palo Alto, CA, USA) was used as a source of cellulase in the enzyme hydrolysis experiments. The specific activity of SPEZYME CP is 3200-4110 IU/g.

[0078] The suspensions were incubated with gentle shaking (180 rpm) at 50 C for 72 hours. Analysis of glucose content was performed after 24 and 72 hours following standard procedures. The results are shown in Table 3 and Figure 3.

TABLE 3

Cellulase (mg/g cellulose)	Swollenin (mg/g cellulose)	Swollenin Content	Glucose (g/L)	
			24 h	72 h
30	0	0%	19.4	28.6
27	3	10%	21.6	29.8
24	6	20%	22.7	33.2
18	12	40%	21.4	31.5
12	18	60%	20.3	29.2
6	24	80%	15.1	22.6
0	30	100%	3	4

Example 4: Swollenin dosing curve on pulp and paper substrates

[0079] Two samples of unbleached softwood pulp were obtained from Smurft Factice (Biganos, FR). One (designated "high lignin") had high lignin content (~15%) and a kappa value (degree of lignification) of 82. The second (designated "low lignin") had low lignin content (~5%) and a kappa value (degree of lignification) of 12. The unbleached pulp was derived through Kraft process, washed and then air dried. Each sample was weighed out to obtain a final composition containing 4% of cellulose (glucan) by dry weight in a 10 mL volume of reaction mixture.

[0080] The softwood pulp used was weighed out so each sample contained exactly 0.4 g cellulose (glucan) by dry weight and dosed with as shown in Table 3. Enzymes were added to the sample substrate in 20 mL scintillation vial to a total liquid volume of 10 mL, which included 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8) and antibiotics (tetracycline and cyclohexamide). A cellulase enzyme complex produced from a genetically modified strain of *Trichoderma reesei*. (i.e., Accellerase 1000™, Genencor) was used as a source of cellulase in the enzyme hydrolysis experiments. Swollenin was used as a purified preparation, as above, and as described in Example 5. The concentration of swollenin was estimated to be approximately 2 mg/ml based on by gel electrophoresis. The purified extract is known not to have cellulase activity. The solid loading is 0.4 g cellulose in total liquid volume of 10 mL, giving a 4% cellulose (glucan) loading.

[0081] The reaction mixture was incubated with gentle shaking (200 rpm) at 50°C for 72 hr. Analysis of glucose and cellobiose concentrations were performed using a Waters HPLC system (Alliance system, Waters Corp., Milford, MA). The HPLC column used for sugar analysis was purchased from BioRad (Aminex HPX-87H, BioRad Inc., Hercules, CA). Both glucose and cellobiose production were measured. The percent cellulose digestion (glucose generated plus cellobiose generated divided by input cellulose) is summarized in Table 4 and

Figure 4. Under the same total protein loading conditions (30 mg), swollenin was essentially capable of replacing 50% of the cellulase from Spezyme CP (Table 3). Supplementing ACCELLERASE with swollenin produced a beneficial effect using both high and low lignin substrates (Table 4).

TABLE 4

Cellulase (mg /g cellulose)	Swollenin (mg/g cellulose)	%cellulose digestion	
		High lignin	Low lignin
10	0	10.6	25.4
20	0	17.8	41.6
10	5	13.1	30.2
10	10	13.2	29.7
10	15	13.6	29.2
10	20	14.8	30.0
10	30	17.1	31.5

Example 5: Purification of swollenin

[0082] Buffer (50 mM Tris, pH 7.0) and sodium chloride (200 mM) were added to 2 L of the ultra-filtered concentrate (UFC) of a culture of a *T. reesei* strain in which the four major cellulases (CBH1, CBH2, EG1, and EG2) were deleted and the swollenin gene over-expressed under control of the cbh1 promoter, while mixing. The pH was adjusted to pH 7.0. To this mixture was added 50 mL of a cellulose-binding domain (CDB) affinity purification agent (*i.e.*, Cbind 200 resin, Part No. 70121, Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK), followed by mixing for 1 hr. This mixture was then filtered using a scintered glass filter unit and the unbound material was collected. The resin with bound swollenin was washed twice using 2 L 50 mM Tris, pH 7.0 and 200 mM sodium chloride. Swollenin was eluted from the resin by mixing the resin with bound swollenin with MilliQ water(2 L) for 0.5 hr and then filtering the mixture, using the scintered glass filter unit, into a 2 L receiver. This water-elution process was repeated to make sure that the swollenin was thoroughly eluted.

[0083] The eluate was concentrated using a ultrafiltration system with a 10K MW cutoff. The concentrate (800 mL) was ready for analysis and further use. The protein concentration of swollenin was estimated to be approximately 3 mg/ml based on by gel electrophoresis. Note that the prepurified extract is known to have no significant cellulase activity.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method for increasing the efficiency of cellulose hydrolysis using a cellulase, the method comprising:

(a) combining a cellulosic substrate, a cellulase composition, and recombinant swollenin, and

(b) incubating the cellulosic substrate, cellulase composition, and swollenin under conditions conducive to hydrolysis of cellulose,

wherein the presence of recombinant swollenin increases the efficiency of cellulase hydrolysis by the cellulase composition compared to that obtained using a the cellulase composition in the absence of swollenin.

2. The method of claim 1, wherein the cellulase composition is a whole cellulase composition.

3. The method of claim 1, wherein the cellulase composition is a mixed cellulase composition.

4. The method of claim 1, wherein the cellulase composition comprises an endoglucanase, a cellobiohydrolases, and a β -glucosidase.

5. The method of claim 1, wherein the cellulase composition comprises one or more primary cellulases.

6. The method of claim 1, wherein the cellulase composition consists essentially of one or more primary cellulases.

7. The method of claims 5 or 6, wherein the primary cellulases are selected from CBH1, CBH2, EG1, EG2, and β -glucosidase.

8. The method of any of claims 1-7, performed in the absence of accessory enzymes other than swollenin.

9. The method of any of claims 1-7, performed in the absence of EG4 and CIP1.

10. The method of any of claims 1-7, performed in the absence of recombinant EG4 or recombinant CIP1.

11. The method of any of claims 1-10, wherein the ratio of cellulases in the cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 20:1 and about 1:5.

12. The method of any of claims 1-10, wherein the ratio of cellulases in the cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 10:1 and about 1:2.

13. The method of any of claims 1-10, wherein the ratio of cellulases in the cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 5:1 and about 1:1.5.

14. The method of any of claims 1-10, wherein the swollenin and the cellulases are present in an approximately equal amount (wt:wt).

15. The method of any of claims 1-14, wherein the cellulosic substrate is selected from the group consisting of wood, wood pulp, papermaking sludge, paper pulp waste streams, particle board, corn stover, corn fiber, rice, paper and pulp processing waste, woody or herbaceous plants, grasses, rice hulls, cottonstraw, corn cobs, distillers grains, leaves, wheat straw, coconut hair, switchgrass, and mixtures thereof.

16. The method of any of claims 1-14, wherein the cellulosic substrate is a softwood.

17. The method of any of claims 1-14 or 16, wherein the cellulosic substrate is high lignin substrate.

18. The method of any of claims 1-14, 16, or 17, wherein the cellulosic substrate has a kappa number of 80 or higher.

19. The method of any of claims 1-18, wherein the percent increase in cellulase efficiency is at least about 10%.

20. An enzyme composition comprising:

(a) a mixed cellulase composition comprising an endoglucanase, a cellobiohydrolases, and a β -glucosidase, and

(b) recombinant swollenin.

21. The composition of claim 20, wherein the composition does not include EG4 or CIP1.
22. The composition of claim 20, wherein the composition does not include recombinant EG4 or recombinant CIP1.
23. The composition of claim 20, wherein the composition does not include recombinant EG4 and does not include recombinant CIP1.
24. The composition of any of claims 20-23, wherein the mixed cellulase composition consists essentially of primary cellulases.
25. An enzyme composition consisting essentially of:
- (a) a mixed cellulase composition comprising an endoglucanase, a cellobiohydrolases, and a β -glucosidase, and
 - (b) recombinant swollenin.
26. The composition of any of claims 20-25, wherein the ratio of cellulases in the mixed cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 20:1 and about 1:5.
27. The composition of any of claims 20-25, wherein the ratio of cellulases in the mixed cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 10:1 and about 1:2.
28. The composition of any of claims 20-25, wherein the ratio of cellulases in the mixed cellulase composition to swollenin (wt:wt) is between about 5:1 and about 1:1.5.
29. The composition of any of claims 20-25, wherein the swollenin and the cellulases are present in an approximately equal amount (wt:wt).
30. The composition of any of claims 20-25, wherein the amount of swollenin (wt:wt) in the composition replaces an approximately equal amount of cellulases (wt:wt) in the composition, with respect to cellulase efficiency on a cellulosic substrate.

1/5

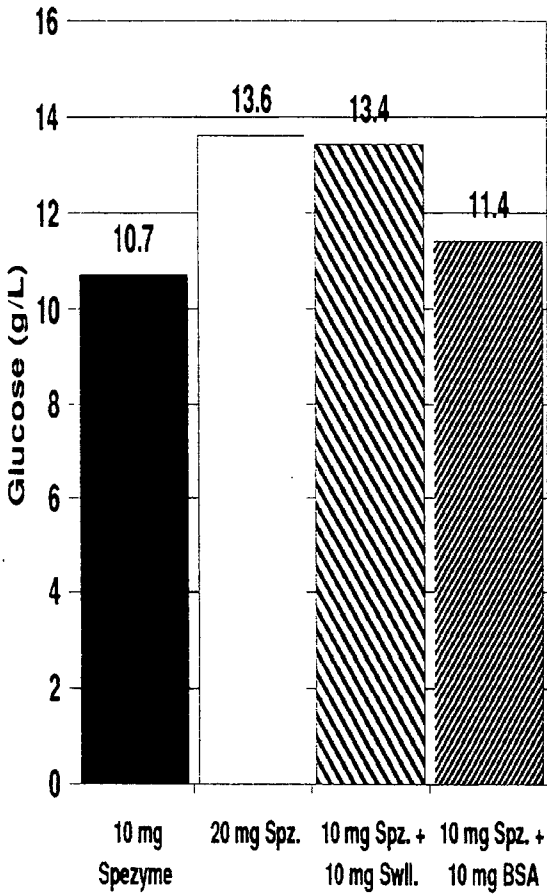


FIGURE 1

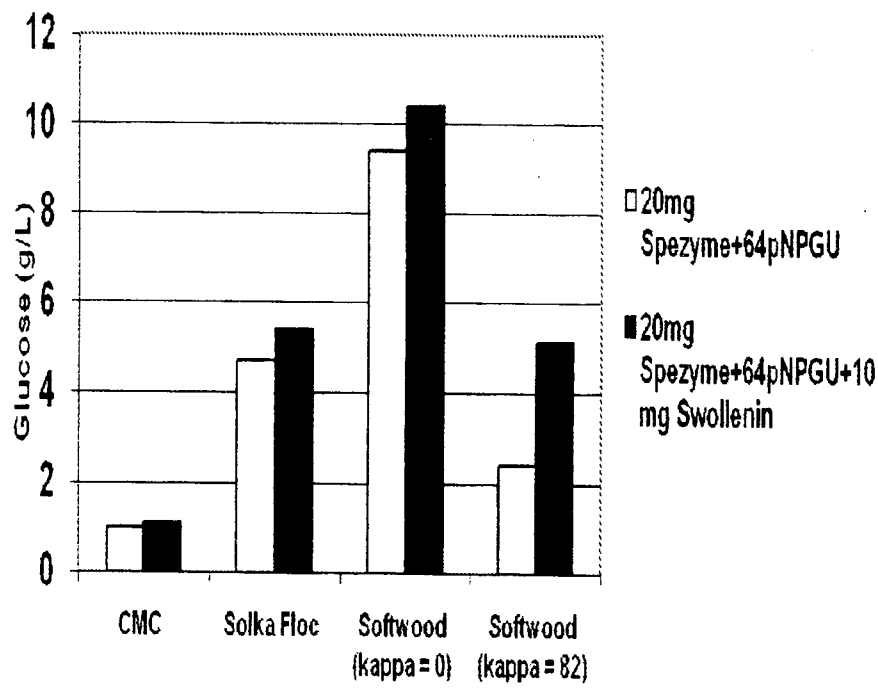


FIGURE 2A

3/5

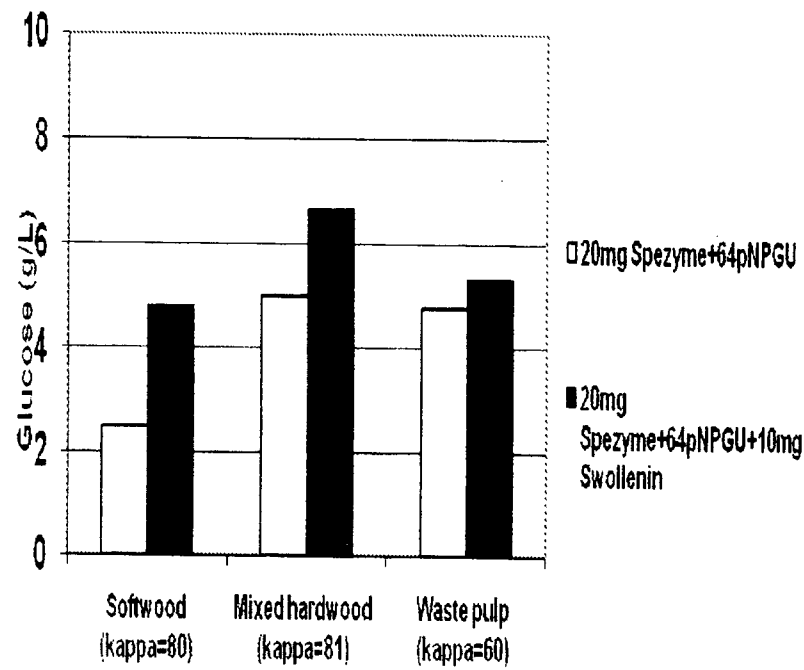


FIGURE 2B

4/5

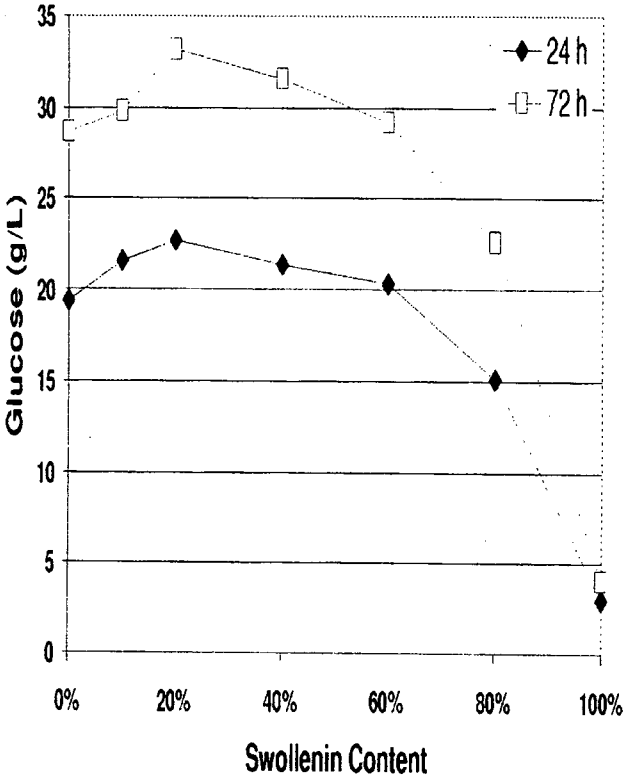


FIGURE 3

5/5

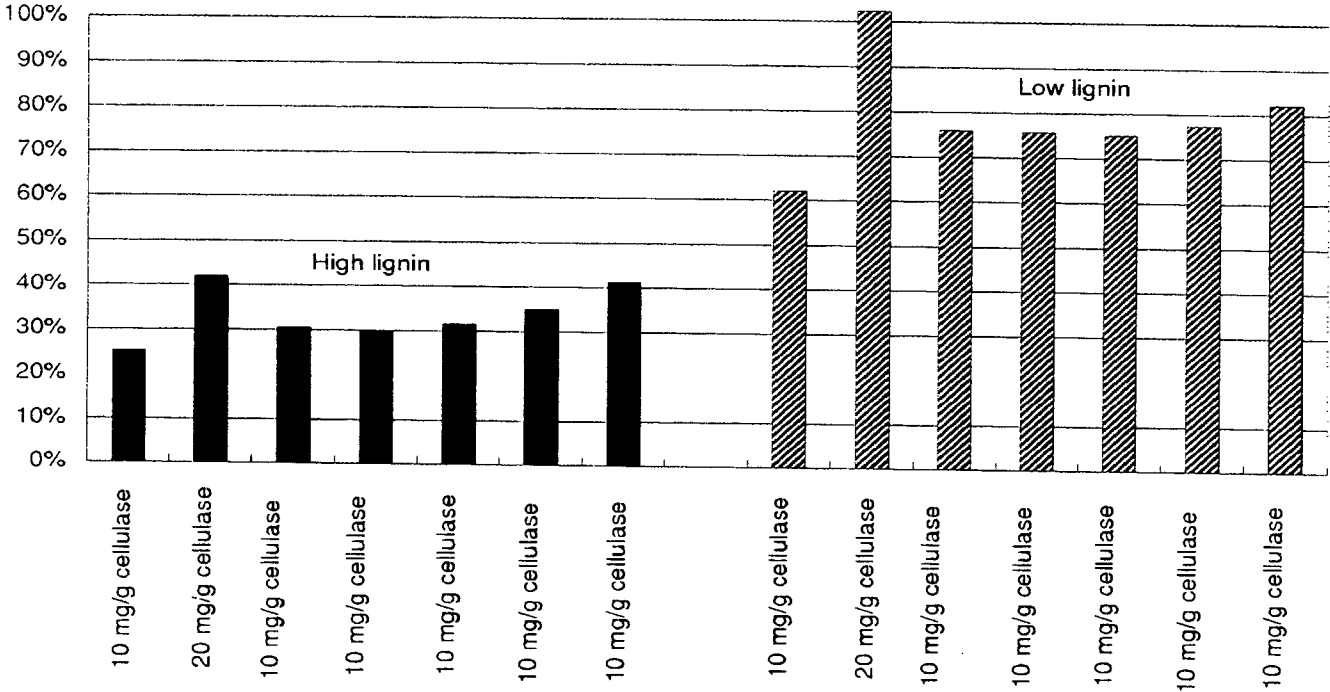


FIGURE 4

COMPOSICIONES DE SWOLLENINA Y MÉTODOS DE INCREMENTAR LA EFICIENCIA DE UNA CELULASA

PRIORIDAD

[001] La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serie No. 61/048,807, presentada el 29 de abril de 2008, la cual se incorpora por este medio por referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[002] Las composiciones y métodos se relacionan con el mejoramiento de la eficiencia de una celulasa en producir azúcares a partir de biomasa celulósica usando el polipéptido swollenina.

ARTE PREVIO

[003] El interés en el etanol como un combustible renovable es más marcado que nunca. El uso del etanol como aditivo de combustibles ha crecido en los últimos años y se espera que continúe creciendo en el futuro inmediato. El uso del etanol reduce la dependencia del petróleo extranjero, disminuye las emisiones de gas de efecto invernadero, proporciona beneficios económicos para las comunidades rurales y constituye un cimiento para una economía de base biológica.

[004] Materias primas potenciales para etanol celulósico incluyen rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, paja de arroz, pulpa de papel, astillas de madera y biomasa de "cultivos energéticos" tales como árboles y pastos de rápido crecimiento (pasto varilla, pasto de praderas, miscanthus), que amplían de manera dramática el material disponible para la producción de etanol. Aunque la biomasa celulósica se encuentra a disposición en grandes cantidades, el reto principal para la comercialización es reducir los costos de un proceso integrado de bio-refinería que produzca etanol en última instancia. A diferencia del almidón, el cual contiene polímeros homogéneos y de fácil hidrolización, las materias primas/sustratos celulósicos típicos para uso en producir etanol no son homogéneos por naturaleza. Aparte de su contenido de celulosa y hemicelulosa convertibles, contienen además lignina y otros componentes, los cuales no pueden convertirse fácilmente en azúcares fermentables.

[005] Típicamente la biomasa en bruto tiene que tratarse previamente por medios

químicos, físicos o biológicos en forma extensiva para producir una materia prima/sustrato apropiada(o) para la producción de etanol. Las técnicas de pretratamientos físicos incluyen uno o más de varios tipos de molienda, trituración, irradiación, steaming/explosión a vapor e hidrotermólisis. Las técnicas de pretratamientos químicos incluyen hidrotermólisis con ácido, álcali, solvente orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono y con pH controlado.

[006] Existe una urgente necesidad de disminuir la cantidad de enzima hidrolítica requerida para convertir la biomasa en azúcar fermentable y/o para disminuir la magnitud del pretratamiento necesario para hacer accesible la biomasa a las enzimas hidrolíticas.

SUMARIO

[007] En un aspecto, se provee un método para aumentar la eficiencia de una celulasa, método que comprende los pasos de (a) combinar un sustrato celulósico, una cantidad de una celulasa entera y una cantidad de una swollenina y (b) incubar el sustrato celulósico, la composición de celulasa mezclada y la swollenina bajo condiciones favorables para la hidrólisis de celulosa. En una implementación preferida, el sustrato celulósico incluye moléculas con enlaces de hidrógeno. El sustrato celulósico puede seleccionarse del grupo conformado por madera, pulpa de madera, lodo de la fabricación de papel, corrientes de desechos de pulpa de papel, tablas de madera prensada, rastrojo de maíz, fibra de maíz, arroz, desecho de procesamiento de pulpa y papel, plantas leñosas o herbáceas, pastos, cascarilla de arroz, paja de algodón, tucas de maíz, granos de destilerías, hojas, paja de trigo, fibras de coco, pasto varilla y mezclas de los anteriores.

[008] En un aspecto relacionado, se provee un método para aumentar la eficiencia de la hidrólisis de celulosa usando una celulasa, método que comprende los pasos de: (a) combinar un sustrato celulósico, una composición de celulasa y una swollenina recombinante, y (b) incubar el sustrato celulósico, la composición de celulasa y la swollenina bajo condiciones favorables para la hidrólisis de celulosa, en donde la presencia de swollenina recombinante aumenta la eficiencia de la hidrólisis de celulosa por composición de celulasa, comparada con la obtenida usando la composición de celulasa en la ausencia de swollenina.

[009] En algunas incorporaciones, la composición de celulasa es una composición de celulasa entera. En algunas incorporaciones, la composición de celulasa es una composición de celulasa mezclada. En algunas incorporaciones, la

composición de de celulasa está constituida por una endoglucanasa, celobiohidrolasas y una β -glucosidasa.

[0010] En algunas incorporaciones, la composición de celulasa está constituida por una o más celulasas primarias. En algunas incorporaciones, la composición de celulasa consiste esencialmente de una o más celulasas primarias. En incorporaciones particulares, las celulasas primarias se seleccionan de CBH1, CBH2, EG1, EG2 y β -glucosidasa.

[0011] En algunas incorporaciones, el método se lleva a cabo en la ausencia de enzimas accesorias distintas de swollenina.

[0012] En algunas incorporaciones, el método se lleva a cabo en la ausencia de EG4 and CIP1. En algunas incorporaciones, el método se lleva a cabo en la ausencia de EG4 recombinante o CIP1 recombinante. En algunas incorporaciones, el método se lleva a cabo en la ausencia de EG4 recombinante y CIP1 recombinante.

[0013] En algunas incorporaciones, la relación de celulasas en la composición de celulasa a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 20:1 y alrededor de 1:5. En algunas incorporaciones, la relación de celulasas en la composición de celulasa a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 10:1 y alrededor de 1:2. En algunas incorporaciones, la relación de celulasas en la composición de celulasa a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 5:1 y alrededor de 1:1.5.

[0014] En algunas incorporaciones, la swollenina y las celulasas están presentes en una cantidad aproximadamente igual (wt:wt). Cantidades ejemplares de swollenina son desde alrededor de 30% a alrededor de 70%, desde alrededor de 40% a alrededor de 60% y alrededor de 50% de la enzimas empleadas en el método (wt:wt).

[0015] En algunas incorporaciones, el sustrato celulósico se selecciona del grupo conformado por madera, pulpa de madera, lodo de la fabricación de papel, corrientes de desechos de pulpa de papel, tablas de madera prensada, rastrojo de maíz, fibra de maíz, arroz, desecho de procesamiento de pulpa y papel, plantas leñosas o herbáceas, pastos, cascarilla de arroz, paja de algodón, tusas de maíz, granos de destilerías, hojas, paja de trigo, fibras de coco, pasto varilla y mezclas de los anteriores. En algunas incorporaciones, el sustrato celulósico es una madera blanda. En algunas incorporaciones, el sustrato celulósico es un sustrato

con alto contenido de lignina. En algunas incorporaciones, el sustrato celulósico tiene un número kappa de 80 o más.

[0016] En algunas incorporaciones, el incremento porcentual en la eficiencia de la celulasa es por lo menos alrededor de 10%, por lo menos alrededor de 15%, o incluso por lo menos alrededor de 20%.

[0017] En otro aspecto, se provee una composición de enzimas, constituida por una composición de celulasa entera o mezclada y una swollenina. La relación de celulasa entera/mezclada a swollenina (wt:wt) puede ser entre alrededor de 20:1 y alrededor de 1:5, inclusive. La relación de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) puede ser además entre alrededor de 10:1 y alrededor de 1:2, inclusive. La relación de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) puede todavía ser entre alrededor de 5:1 y alrededor de 1:1.5, inclusive.

[0018] En un aspecto relacionado, se provee una composición de enzimas, constituida por: (a) una composición de celulasa mezclada constituida a su vez por una endoglucanasa, celobiohidrolasas y una β -glucosidasa, y (b) swollenina recombinante.

[0019] En algunas incorporaciones, la composición no incluye EG4 o CIP1. En algunas incorporaciones, la composición no incluye EG4 recombinante o CIP1 recombinante. En algunas incorporaciones, la composición no incluye EG4 recombinante y no incluye CIP1 recombinante.

[0020] En algunas incorporaciones, la composición de celulasa mezclada consiste esencialmente de celulasas primarias.

[0021] En otro aspecto relacionado, se provee una composición de enzimas, la cual consiste esencialmente de: (a) una composición de celulasa mezclada que está constituida por una endoglucanasa, celobiohidrolasas y una β -glucosidasa, y (b) swollenina recombinante.

[0022] En algunas incorporaciones, la relación de celulasas en cualquiera de las composiciones de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 20:1 y alrededor de 1:5. En algunas incorporaciones, la relación de celulasas en cualquiera de las composiciones de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 10:1 y alrededor de 1:2. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde la relación de celulasas en cualquiera de las

composiciones de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 5:1 y alrededor de 1:1.5. En algunas incorporaciones, la swollenina y las celulasas están presentes en una cantidad aproximadamente equivalente (wt:wt).

[0023] En algunas incorporaciones, la cantidad de swollenina (wt:wt) en la composición reemplaza una cantidad aproximadamente igual de celulasas (wt:wt) en la composición, con respecto a la eficiencia de la celulasa en un sustrato celulósico.

[0024] Estos y otros aspectos de las composiciones y métodos serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025] Figura 1 ilustra la producción de glucosa por una composición de celulasa mezclada en la presencia y ausencia de swollenina.

[0026] Figuras 2A y 2B ilustran el efecto de la swollenina sobre la hidrólisis de celulosa de varios sustratos celulósicos.

[0027] Figura 3 ilustra la producción de glucosa con 30 mg de enzima total por g de celulosa, proveyéndose la enzima en varias relaciones de celulasa mezclada a swollenina.

[0028] Figura 4 ilustra la digestión porcentual de celulosa de pulpa de madera blanda en diferentes concentraciones relativas de celulasa mezclada y swollenina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

[0029] Antes de describir las presentes composiciones y métodos, se definen los siguientes términos y expresiones. A los términos no definidos debe asignárseles el significado ordinario como se usa en el arte.

[0030] Tal como se emplea en esta especificación, "swollenina" se refiere a una proteína/polipéptido que tiene la capacidad de facilitar el debilitamiento de papel de filtro y producir expansión de fibras de algodón sin poseer actividad celulolítica, es decir, actividad catalítica que implica la rotura de cadenas individuales de

celulosa en monómeros (glucosa) u oligómeros (polisacáridos) más pequeños. Aunque es útil definir las swolleninas en líneas generales en términos de las proteínas expansinas descritas en McQueen-Mason *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:1425-33, es igualmente evidente que las swolleninas microbianas tienen propiedades distintas, por ejemplo, las swolleninas microbianas son proteínas mucho más grandes que las expansinas vegetales y tienen un bajo nivel de identidad de secuencia con las expansinas vegetales. Más aún, ciertas proteínas swolleninas microbianas existen en conjunción con un dominio de unión a celulosa y pueden existir además en conjunción con un dominio catalítico de celulasa.

[0031] Tal como se emplea en esta especificación, el término "sustrato celulósico" o "materia prima celulósica" se refiere a materiales que están compuestos de celulosa, hemicelulosa y β -glucanos que se enlazan cruzadamente unos con otros, y con lignina. Tales sustratos celulósicos pueden contener igualmente otros materiales tales como pectinas, proteínas, almidón y lípidos, pero preferiblemente tendrán celulosa, hemicelulosa y β -glucanos como componentes primarios.

[0032] Tal como se emplea en esta especificación, los términos "purificación" y "aislamiento," con referencia a swollenina, se refieren a la separación de swollenina de algunos o todos los constituyentes de ocurrencia natural con los cuales se asocia en la naturaleza, o de algunos o todos los constituyentes con los cuales se asocia luego de la expresión heteróloga. El término "constituyentes" se refiere generalmente a otras proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, material de la pared celular y otros componentes celulares.

[0033] Tal como se emplea en esta especificación, el término "valor kappa" se refiere al grado de lignificación de un sustrato celulósico. Los valores kappa pueden determinarse empleando, v.g., el documento ISO 302:2004 de la Organización Internacional de Normalización.

[0034] Tal como se emplea en esta especificación, el término "celulosa" se refiere a un polisacárido conformado por unidades de D-glucosa con enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$ que tiene la fórmula general $(C_6H_{10}O_5)_n$. La celulosa es el componente estructural de la pared celular primaria de plantas verdes, muchas formas de algas y los oomycetes.

[0035] Tal como se emplea en esta especificación, el término "celulasa" se refiere a una enzima capaz de hidrolizar polímeros de celulosa en oligómeros más cortos y/o glucosa.

[0036] Tal como se emplea en esta especificación, el término "composición/preparación/mezcla de celulasa entera" o similares se refiere tanto a composiciones de ocurrencia natural como de ocurrencia no natural, que incluyen una pluralidad de celulasas producidas por un organismo, por ejemplo un hongo filamentoso. Un ejemplo de una composición de celulasa entera es un medio (es decir, caldo de cultivo) en el que se cultivan hongos filamentosos, el cual incluye celulasas secretadas, tales como una o más celobiohidrolasas, una o más endoglucanasas y una o más β -glucosidasas en una relación predeterminada.

[0037] Tal como se emplea en esta especificación, una "endoglucanasa (EG)" es una enzima (EC 3.2.1.4) que actúa principalmente sobre las partes amorfas de la fibra de celulosa para hidrolizar enlaces glucosídicos β -1,4 internos en regiones de baja cristalinidad.

[0038] Tal como se emplea en esta especificación, "celobiohidrolasas (CBH)" o "exoglucanasas" es una enzima (EC 3.2.1.91) que hidroliza celobiosa del extremo reductor o no reductor de celulosa para degradar celulosa cristalina.

[0039] Tal como se emplea en esta especificación, una " β -glucosidasa" o " β -D-glucósido glucohidrolasa" es una enzima (EC 3.2.1.21) que actúa para liberar unidades de D-glucosa de celobiosa, celo-oligosacáridos y otros glucósidos.

[0040] Tal como se emplea en esta especificación, "hemicelulosa" es un componente polimérico de materiales vegetales que contiene monómeros de azúcar distintos de glucosa, en contraste con celulosa, la cual contiene únicamente glucosa. Además de glucosa, la hemicelulosa puede incluir xilosa, mannososa, galactosa, rhamnosa y arabinosa, y similares, siendo la xilosa el monómero de azúcar más común. Las hemicelulosas contienen la mayoría de azúcares D-pentosa y, ocasionalmente, pequeñas cantidades de L-azúcares. Los azúcares en la hemicelulosa pueden conectarse por enlaces éster así como por enlaces glucosídicos. Formas ejemplares de hemicelulosa incluyen, pero no se limitan a, galactano, mannano, xilano, arabanano, arabinoxilano, glucomannano, galactomanano, y similares.

[0041] Tal como se emplea en esta especificación, el término "hemicelulasa" se refiere a una clase de enzimas capaces de descomponer hemicelulosa en sus azúcares componentes o polímeros más cortos, e incluye endohidrolasas, exohidrolasas y varias esterasas.

[0042] Tal como se emplea en esta especificación, una "celulasa primaria" o "enzima celulolítica primaria" es una celulasa que se requiere para hidrolizar eficientemente celulosa o para producir glucosa de un sustrato celulósico. Las celulasas primarias incluyen CBH1, CBH2, EG1, EG2 y β -glucosidasa.

[0043] Tal como se emplea en esta especificación, el término "enzima accesoria" se refiere a una enzima que puede incluirse en una composición de celulasa para mejorar la eficiencia de una celulasa (o combinación de celulasas), pero que no se requiere para la hidrólisis eficiente de celulosa o la producción de glucosa de un sustrato celulósico. Las enzimas accesorias incluyen swollenina, EG4, proteína inducida por celulosa (CIP1 - *cellulose induced protein*) y xilanasa.

[0044] Tal como se emplea en esta especificación, una composición de "ocurrencia natural" es una producida en la naturaleza o por un organismo que ocurre en la naturaleza.

[0045] Tal como se emplea en esta especificación, una proteína "variante" difiere de la proteína "progenitora", de la cual se deriva, por la sustitución, eliminación, o adición de un pequeño número de residuos de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más residuos de aminoácidos. En algunos casos, la proteína progenitora es un polipéptido "tipo silvestre," "nativo," o "de ocurrencia natural". Proteínas variantes pueden describirse como las que tienen una cierta identidad porcentual de secuencia con una proteína progenitora, v.g., por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o incluso por lo menos 99%, la cual puede determinarse usando un programa apropiado de software conocido en el arte, por ejemplo los descritos en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel *et al.* (eds) (1987) suplemento 30, sección 7.7.18). Programas preferidos incluyen el VECTOR NTI ADVANCE™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), el programa GCG PILEUP, FASTA (Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:2444-2448), y BLAST (BLAST Manual, Altschul *et al.*, Nat'l. Cent. Biotechnol. Inf., Nat'l. Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., y Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402). Otro programa de alineamiento preferido es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA), empleando preferiblemente parámetros por defecto. Otro programa

de software de secuencias que se emplea es el Programa TFASTA Data Searching, disponible en el Paquete de Software de Secuencias Versión 6.0 (Sequence Software Package Version 6.0) (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI).

[0046] El uso del singular incluye el plural a menos que específicamente se manifieste lo contrario, y el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique otra cosa. Los términos "están constituidos," "que está constituido," "está constituido," "incluyen," "que incluye/incluyendo," e "incluye" no pretenden ser limitantes. El término "que está constituido esencialmente por" significa que, opcionalmente, pueden estar presentes otros componentes o pasos, pero no son esenciales para producir u originar un efecto descrito.

[0047] Todas las patentes y publicaciones, incluyendo todas las secuencias de aminoácidos y las secuencias nucleotídicas divulgadas en tales patentes y publicaciones, mencionadas en esta especificación, se incorporan expresamente por referencia.

[0048] Las siguientes abreviaturas/acróimos tienen los siguientes significados, a menos que se especifique lo contrario:

°C	grados centígrados
BSA	albúmina sérica bovina
CBD	dominio de unión a carbohidrato
cDNA	ADN complementario
CMC	carboximetilcelulosa
CMC	carboximetilcelulosa
dH ₂ O o DI	agua desionizada
dH ₂ O	agua desionizada, filtración Milli-Q
DNA	ácido desoxirribonucleico
ds o DS	contenido de sólidos secos
EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
eq.	equivalente
ETOH	etanol
g o gm	gramo
GA	glucoamilasa
Genencor	Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA, USA
H ₂ O	agua
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento/a alta presión
hr	hora
IPTG	isopropil β-D-tiogalactosida
IU	unidad internacional
kDa	kiloDalton
kg	kilogramo
L	litro
M	molar
mg	miligramo

min y '	minuto
mL y ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MW	peso molecular
N	normal
PCS	rastrojo de maíz pretratado (<i>pretreated corn stover</i>)
PEG	polietilenglicol
pl	punto isoelectrico
pNPG	p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido
RNA	ácido ribonucleico
RPM	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	dodecil sulfato sódico – electroforesis en gel de poliacrilamida
sec y "	segundo
sp./spp.	especie (singular/plural)
Spz.	SPEZYME
U	unidad
UFC	concentrado ultra-filtrado (<i>ultra-filtered concentrate</i>)
v/v	volumen/volumen
w/v	peso/volumen
w/w	peso/peso
wt%	porcentaje en peso
μ g	microgramo
μ L y μ l	microlitro
μ m	micrometro
μ M	micromolar

II. El uso de swollenina para aumentar el rendimiento de azúcar de materias primas celulósicas

[0049] Un aspecto de las composiciones y métodos se refiere a mejorar el rendimiento de azúcar de materias primas/sustratos celulósicos suplementando una composición de celulosa con swollenina. En un aspecto, se provee un método para mejorar la hidrólisis enzimática de celulosa, método que comprende los pasos de: (a) combinar un sustrato celulósico, una composición de celulosa mezclada y swollenina; y (b) incubar el sustrato celulósico, una composición de celulosa mezclada y swollenina bajo condiciones favorables para hidrolizar celulosa. Las composiciones y métodos se basan en la sorprendente observación de que el reemplazo de hasta 50% de una composición de celulosa mezclada con una swollenina puede mejorar sustancialmente la cantidad de azúcar fermentable generada de un sustrato celulósico.

[0050] Una variedad de proteínas, llamadas "expansinas" se han identificado en una variedad de plantas alimenticias. Se cree que estas expansinas mejoran la absorción osmótica de agua, que es la fuerza impulsora de la expansión de células vegetales. A medida que el agua penetra en la célula, el protoplasto se

expande pero se restringe por la pared celular, que se mantiene cohesionada por un complejo rígido de polímeros de microfibrillas de celulosa incorporadas en una matriz pegajosa de pectinas ("**a glue-like matrix**"), hemicelulosas y proteínas. La familia expansinas de proteínas, halladas en varias frutas, vegetales, granos y avena, funcionan como un factor de "aflojamiento de la pared", el cual altera las propiedades mecánicas de la pared de las células no maduras y le permite experimentar un proceso de alargamiento (véase, v.g., Shcherban *et al.* (1995) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9245-49; Wang *et al.* (1994) *Biotech. Lett.* 16:955-58; Keller *et al.* (1995) *The Plant Journal* 8:795-802; Li *et al.* (1993) *Planta*, vol. 191, páginas 349-56). Las expansinas juegan un papel importante en el crecimiento de las células vegetales, ablandamiento de las frutas, abscisión, emergencia de radículas, invasión de los tubos polínicos del estigma y el pistilo, función del meristemo y otros procesos de desarrollo en los que ocurre el aflojamiento de la pared celular.

[0051] Más recientemente, se han identificado enzimas tipo expansina de hospederos microbianos. Una tal enzima, llamada swollenina, derivada de *Trichoderma reesei*, se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,458,928 (incorporada en esta especificación por referencia). La secuencia de swollenina se asemeja parcialmente a las expansinas vegetales, las que se cree que rompen los enlaces de hidrógeno entre los polisacáridos en una pared celular. La secuencia polipeptídica nativa, incluyendo el péptido señal N-terminal, se muestra como SEQ ID NO: 1. La secuencia polipeptídica madura se muestra como SEQ ID NO: 2. A diferencia de las expansinas, la swollenina madura incluye en su N-término un dominio de unión a celulosa (CBD - *cellulose-binding domain*), que se enlaza por una región conectora a un dominio tipo expansina. Un CBD de esta clase ocurre igualmente en celulasas bien conocidas de *T. reesei*, tales como CBH I y EG II. A diferencia de la swollenina, las celulasas son hidrolíticas, por lo menos en cierta medida.

MetAlaGlyLysLeuIleLeuValAlaLeuAlaSerLeuValSerLeuSerIleGlnGln
 AsnCysAlaAlaLeuPheGlyGlnCysGlyGlyIleGlyTrpSerGlyThrThrCysCys
 ValAlaGlyAlaGlnCysSerPheValAsnAspTrpTyrSerGlnCysLeuAlaSerThr
 GlyGlyAsnProProAsnGlyThrThrSerSerSerLeuValSerArgThrSerSerAla
 SerSerSerValGlySerSerSerProGlyGlyAsnSerProThrGlySerAlaSerThr
 TyrThrThrThrAspThrAlaThrValAlaProHisSerGlnSerProTyrProSerIle
 AlaAlaSerSerCysGlySerTrpThrLeuValAspAsnValCysCysProSerTyrCys
 AlaAsnAspAspThrSerGluSerCysSerGlyCysGlyThrCysThrThrProProSer
 AlaAspCysLysSerGlyThrMetTyrProGluValHisHisValSerSerAsnGluSer
 TrpHisTyrSerArgSerThrHisPheGlyLeuThrSerGlyGlyAlaCysGlyPheGly
 LeuTyrGlyLeuCysThrLysGlySerValThrAlaSerTrpThrAspProMetLeuGly
 AlaThrCysAspAlaPheCysThrAlaTyrProLeuLeuCysLysAspProThrGlyThr
 ThrLeuArgGlyAsnPheAlaAlaProAsnGlyAspTyrTyrThrGlnPheTrpSerSer
 LeuProGlyAlaLeuAspAsnTyrLeuSerCysGlyGluCysIleGluLeuIleGlnThr
 LysProAspGlyThrAspTyrAlaValGlyGluAlaGlyTyrThrAspProIleThrLeu
 GluIleValAspSerCysProCysSerAlaAsnSerLysTrpCysCysGlyProGlyAla
 AspHisCysGlyGluIleAspPheLysTyrGlyCysProLeuProAlaAspSerIleHis
 LeuAspLeuSerAspIleAlaMetGlyArgLeuGlnGlyAsnGlySerLeuThrAsnGly
 ValIleProThrArgTyrArgArgValGlnCysProLysValGlyAsnAlaTyrIleTrp
 LeuArgAsnGlyGlyGlyProTyrTyrPheAlaLeuThrAlaValAsnThrAsnGlyPro
 GlySerValThrLysIleGluIleLysGlyAlaAspThrAspAsnTrpValAlaLeuVal
 HisAspProAsnTyrThrSerSerArgProGlnGluArgTyrGlySerTrpValIlePro
 GlnGlySerGlyProPheAsnLeuProValGlyIleArgLeuThrSerProThrGlyGlu
 GlnIleValAsnGluGlnAlaIleLysThrPheThrProProAlaThrGlyAspProAsn
 PheTyrTyrIleAspIleGlyValGlnPheSerGlnAsn (SEQ ID NO: 1)

GlnGlnAsnCysAlaAlaLeuPheGlyGlnCysGlyGlyIleGlyTrpSerGlyThrThr
 CysCysValAlaGlyAlaGlnCysSerPheValAsnAspTrpTyrSerGlnCysLeuAla
 SerThrGlyGlyAsnProProAsnGlyThrThrSerSerSerLeuValSerArgThrSer
 SerAlaSerSerSerValGlySerSerSerProGlyGlyAsnSerProThrGlySerAla
 SerThrTyrThrThrThrAspThrAlaThrValAlaProHisSerGlnSerProTyrPro
 SerIleAlaAlaSerSerCysGlySerTrpThrLeuValAspAsnValCysCysProSer
 TyrCysAlaAsnAspAspThrSerGluSerCysSerGlyCysGlyThrCysThrThrPro
 ProSerAlaAspCysLysSerGlyThrMetTyrProGluValHisHisValSerSerAsn
 GluSerTrpHisTyrSerArgSerThrHisPheGlyLeuThrSerGlyGlyAlaCysGly
 PheGlyLeuTyrGlyLeuCysThrLysGlySerValThrAlaSerTrpThrAspProMet
 LeuGlyAlaThrCysAspAlaPheCysThrAlaTyrProLeuLeuCysLysAspProThr
 GlyThrThrLeuArgGlyAsnPheAlaAlaProAsnGlyAspTyrTyrThrGlnPheTrp

[0052] En algunas incorporaciones, la swollenina es una swollenina variante de *T. reesei* de ocurrencia natural que tiene por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo

menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o incluso por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas incorporaciones, la swollenina se obtiene de un organismo diferente, y tiene por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o incluso por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0053] En incorporaciones adicionales, la swollenina es una swollenina variante genomanipulada ("***an engineered variant swollenin***"), que incluye por lo menos una sustitución, inserción, o eliminación que imparte una característica ventajosa a la swollenina, y en donde el resto de la secuencia de aminoácidos (es decir, que no incluye la una o más sustituciones, inserciones, o eliminaciones) tiene por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, o incluso por lo menos 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La sustitución, inserción, o eliminación puede estar en el CBD N-terminal, afectando en esa forma la unión a celulosa, o en una porción del polipéptido distinta del CBD, afectando así, v.g., la rotura de los enlaces de hidrógeno en un sustrato celulósico. En incorporaciones relacionadas, la swollenina es un fragmento o dominio de swollenina que conserva la actividad biológica descrita en esta especificación. En incorporaciones particulares, el fragmento carece del CBD.

[0054] Sustratos celulósicos apropiados para uso con swollenina incluyen madera, pulpa de madera, lodo de fabricación de papel, corrientes de desechos de pulpa de papel, tablas de madera prensada, rastrojo de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, desechos de procesamiento de pulpa y papel, plantas leñosas o herbáceas, pastos, cascarilla de arroz, paja de algodón, tusas de maíz, granos de destilerías, hojas, paja de trigo, fibra de coco, pasto varilla y mezclas de los anteriores. Un aspecto de las presentes composiciones y métodos es el descubrimiento de que la adición de swollenina a celulosa mejora la producción de azúcar en sustratos leñosos y herbáceos. Por otro lado, no se cree que la swollenina sea ventajosa para uso con sustratos a base de granos o a base de frutas. Generalmente, debido a la capacidad de la swollenina de interrumpir los enlaces de hidrógeno, todos los sustratos en los cuales son prevalentes los enlaces de hidrógeno (v.g.,

celulosa cristalina) son probablemente susceptibles de la actividad swollenina y, en consecuencia, son sustratos apropiados. Sustratos celulósicos ejemplares tienen un alto contenido de lignina, como en el caso, v.g., de maderas blandas. En algunos casos, el sustrato celulósico tiene un número kappa de 80 o mayor, por ejemplo, 80, 81, 82, o mayor.

[0055] El sustrato celulósico puede usarse directamente (*es decir*, sin pretratamiento), o puede someterse a pretratamiento empleando métodos convencionales que son conocidos en el arte. Pretratamientos ejemplares son pretratamientos químicos, físicos y biológicos. Las técnicas de pretratamientos físicos incluyen uno o más de varios tipos de molienda, trituración, irradiación, steaming/explosión de vapor e hidrotérmólisis. Las técnicas de pretratamientos químicos incluyen, sin limitación, hidrotérmólisis con ácido diluido, álcali, solvente orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono y con pH controlado. Las técnicas de pretratamientos biológicos incluyen, sin limitación, aplicar microorganismos solubilizantes de lignina al sustrato.

[0056] La hidrólisis enzimática de celulosa se lleva preferiblemente a cabo a una temperatura en el intervalo de alrededor de 45°C a alrededor de 75°C, y a un pH de desde alrededor de 3.5 a alrededor de 7.5. La concentración inicial de celulosa en el reactor de hidrólisis, antes de empezar la hidrólisis, es preferiblemente desde alrededor de 4% (w/w) a alrededor de 15% (w/w). La dosificación combinada de todas las enzimas celulasas primarias puede ser desde alrededor de 5 a alrededor de 45 mg de proteína por gramo de celulosa. La hidrólisis puede llevarse a cabo por un período de tiempo de desde alrededor de 12 horas a alrededor de 200 horas. Preferiblemente, la hidrólisis se lleva a cabo por un período de 15 horas a 100 horas. Debe tenerse en cuenta que las condiciones de reacción no pretenden limitar la invención en alguna manera y pueden ajustarse según se desee por los expertos en el arte.

[0057] El proceso de hidrólisis convierte preferiblemente alrededor de 80% a alrededor de 100% de la celulosa en azúcares solubles, o cualquier intervalo intermedio. Más preferiblemente, el proceso de hidrólisis enzimática convierte desde alrededor de 90% a alrededor de 100% de la celulosa en azúcares solubles, o incluso desde alrededor de 98% a alrededor de 100% de la celulosa en azúcares solubles.

[0058] La hidrólisis que usa la composición de celulasas mezclada y swollenina puede ser hidrólisis por lotes, hidrólisis continua, o una combinación de las

anteriores. La hidrólisis puede ser agitada, no mezclada, o una combinación de las anteriores. La hidrólisis se lleva típicamente a cabo en un reactor de hidrólisis. Las enzimas celulasas primarias y swollenina se agregan a la materia prima celulósica pretratada (también designada el "sustrato") antes de, durante, o después de la adición del sustrato al reactor de hidrólisis. La celulasa y la swollenina pueden agregarse simultánea o consecutivamente a la hidrólisis. Durante el extendido período de la hidrólisis se agregan celulasa y/o swollenina adicionales al sustrato celulósico parcialmente digerido.

[0059] La swollenina puede aislarse de una cepa microbiana que la produce naturalmente, pero preferiblemente se produce por un organismo genéticamente modificado, en donde un gen, que codifica swollenina o un fragmento activo de la misma, se conecta operativamente a un promotor fuerte para sobreexpresar la proteína. El constructo génico resultante (es decir, la secuencia de ácido nucleico), que incluye por lo menos parte del gen que codifica la swollenina, se usa para transformar una célula hospedera heteróloga u homóloga, que posteriormente se cultiva bajo condiciones para expresar la proteína deseada. Métodos de expresión de proteína recombinante son conocidos en el arte. Células hospederas apropiadas incluyen, por ejemplo, hongos filamentosos, tales como *Trichoderma* spp. o *Aspergillus* spp., y levadura. Un modo preferido para preparar swollenina es mediante la transformación de una célula hospedera de *Trichoderma* spp. con un constructo de ADN que incluye por lo menos un fragmento del ADN que codifica una porción o la totalidad de la swollenina, que se adhiere funcionalmente a un promotor. La célula hospedera transformada se cultiva entonces bajo condiciones con el fin de expresar la proteína deseada.

[0060] La swollenina se produce preferiblemente como una proteína extracelular que se secreta en el medio de cultivo, el cual puede usarse directamente como una fuente de swollenina (v.g., como caldo de cultivo), o usarse para obtener swollenina aislada y/o purificada empleando métodos conocidos en el arte de las proteínas. Alternativamente, donde una swollenina se expresa como una proteína intracelular, las células se rompen, seguidas por aislamiento y/o purificación de la swollenina intracelular.

[0061] Donde se desea obtener la proteína swollenina en la ausencia de actividad celolítica, es útil obtener, por ejemplo, una cepa de células hospederas de *Trichoderma* a las que se les hayan eliminado uno o más genes de celulasa antes de la introducción de un constructo de ADN o plásmido que contenga el fragmento de ADN que codifica la swollenina. Tales cepas pueden prepararse por el método

divulgado en la Patente de los Estados Unidos No. 5,246,853 y WO 92/06209, cuyas divulgaciones se incorporan por este medio por referencia. Expresando una swollenina en un microorganismo hospedero, que carece de uno o más genes de celulasa, se simplifican los procesos de identificación y subsiguiente purificación. No obstante, para uso en la presente invención, no es necesario excluir completamente enzimas celulolíticas de la swollenina purificada.

[0062] En incorporaciones particulares, la swollenina, o un derivado de la misma, se recupera en forma activa de la célula hospedera luego del cultivo en medio líquido. La swollenina puede incluir procesamiento pos-transduccional adecuado. La swollenina expresada puede recuperarse del medio por técnicas convencionales incluyendo separaciones de las células del medio por centrifugación, filtración y precipitación de las proteínas en el sobrenadante o filtrado con una sal, por ejemplo, sulfato de amonio. Alternativa o adicionalmente, pueden utilizarse procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de afinidad. Anticuerpos (policlonales o monoclonales) pueden cultivarse contra swollenina purificada, fragmentos de swollenina purificada, o péptidos sintéticos correspondientes a porciones de swollenina.

[0063] En algunas incorporaciones, las proteínas swollenina se aíslan o purifican de otros componentes con las cuales se asocia naturalmente, u otro componente de células usadas para expresar la swollenina. Una swollenina purificada no necesita estar desprovista de todos los demás componentes, pero tiene una mayor relación de swollenina a proteínas extrañas (y/u otros componentes) que la hallada en el estado natural, en medio de cultivo, o en células lisadas. La purificación puede realizarse por técnicas reconocidas de separación, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, separación hidrofóbica, diálisis, tratamiento con proteasas, precipitación con sulfato de amonio u otra sal, centrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño, filtración, microfiltración, electroforesis en gel, o separación en un gradiente para extraer células enteras, residuos de células, impurezas, proteínas extrañas (incluyendo enzimas), que son indeseables en la composición final. Es posible además agregar entonces componentes a una composición que contiene swollenina, los cuales proporcionan beneficios adicionales, por ejemplo, agentes activadores, agentes anti-inhibitorios, iones, compuestos para controlar el pH, u otras enzimas, tales como celulasa.

[0064] La cantidad de swollenina agregada a una mezcla hidrolítica puede variar

de acuerdo con la biomasa que se va a tratar, pero típicamente es de alrededor de 0.1 a alrededor de 30 mg/g de celulosa, preferiblemente alrededor de 2 mg/g a alrededor de 20 mg/g de celulosa e, incluso, alrededor de 5 mg/g a alrededor de 15 mg/g de celulosa. Alternativamente, la cantidad de swollenina usada en la presente invención puede determinarse basándose en el sustrato celulósico total o biomasa bruta o pretratada total. El tratamiento de la swollenina se lleva a cabo a alrededor de 20 a alrededor de 80°C, preferiblemente a alrededor de 30 a alrededor de 50°C, con un intervalo de pH de alrededor de 3 a alrededor de 10, preferiblemente alrededor de 4 a alrededor de 6, durante alrededor de 0.1 a alrededor de 24 horas, preferiblemente alrededor de 2 a alrededor de 6 horas, con alrededor de 1% a alrededor de 30% de carga (seca) de sólidos, preferiblemente alrededor de 15% a alrededor de 25%.

[0065] Típicamente, las enzimas se usarán en una relación de alrededor de 5:1 a alrededor de 1:5 celulasa:swollenina. Más preferiblemente, las enzimas se usan en una relación de alrededor de 2:1 a alrededor de 1:2 celulasa:swollenina. La relación relativa de enzima puede variar dependiendo del tipo de sustrato celulósico. En algunos casos, la swollenina representa una cantidad aproximadamente igual de enzima en una composición para tratar un material celulósico, comparada con la cantidad de celulasa en la composición. Una cantidad aproximadamente igual significa que alrededor de 40-60% de las enzimas son swollenina, *v.g.*, aproximadamente 50%. Un sustrato celulósico microcristalino (*es decir*, pulpa de madera blanda) rico en enlaces de hidrógeno puede requerir más swollenina que para un sustrato amorfo (*es decir*, celulosa expandida con ácido fosfórico) con un grado relativamente más bajo de enlaces de hidrógeno.

[0066] Una composición de celulasa mezclada para el uso como se describe puede tener tres actividades celulolíticas sinérgicas: actividades endo-1,4-β-D-glucanasa, exo-1,4-β-glucosidasa y β-D-glucosidasa. Cada una de estas actividades puede proveerse por una o más enzimas celulasa, que representan las celulosas primarias (y las actividades de las mismas) en las presentes composiciones y métodos. Cualquier enzima celulasa en la composición de celulasa mezclada puede proveer una o más de las tres actividades celulolíticas. Celulasas primarias ejemplares incluyen CHB1, CBH2, EG1, EG2 y β-glucosidasa. La composición de celulasa puede ser una proteína de solución acuosa en agua, una suspensión de proteína en agua, un polvo sólido o gránulo, o un gel. Una combinación que está constituida por enzimas celulasa puede incluir aditivos, tales como soluciones amortiguadoras, detergentes, estabilizantes, materiales de

[0069] Aspectos de las presentes composiciones y métodos pueden entenderse con más detalle a la luz de los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse como limitantes. Las modificaciones a los materiales y métodos serán evidentes a los expertos en el arte.

EJEMPLOS

[0070] Los siguientes ejemplos se proveen para ilustrar las composiciones y métodos.

Ejemplo 1: Evaluación de la swollenina sobre la pulpa de madera blanda

[0071] Pulpa de madera blanda equivalente a 0.1 g de celulosa se agregó a un vial de escintilación de vidrio de 20 mL para cada prueba. Cada vial se lleva a un volumen total de 10 mL, menos la cantidad de enzima a agregarse en cada prueba, por la adición de agua destilada. Los contenidos de cada vial se llevaron a 50°C calentándolos en el incubador ajustado a $50^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A cada vial se agregaron 1 o 2 mg de una composición de celulasa entera obtenida de *Trichoderma* (es decir, SPEZYME® CP, actividad específica = 3200-4110 IU/g; Genencor International, Inc., Palo Alto, CA, USA,) a una concentración final de celulasa de 10 mg de celulasa por g de celulosa o 20 mg de celulasa por g de celulosa (como se describe en Tabla 1). Swollenina purificada o Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma), como control, se agregó a una concentración final de 10 mg/g de celulosa (Tabla 1). La swollenina se preparó, purificó y caracterizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Saloheimo *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4202-11 (véase Ejemplo 5, *infra*). La concentración de la proteína swollenina se calculó por electroforesis en gel y fue de aproximadamente 3 mg/ml en ambas preparaciones.

[0072] Los viales se cerraron e incubaron con una suave rotación (180 RPM) a 50°C durante un período de 24 horas. Se tomó una alícuota para análisis. Los sólidos se extrajeron por centrifugación. El sobrenadante se sometió a análisis de glucosa empleando un analizador de glucosa YSI o un sistema HPLC Waters Alliance. Los resultados se muestran en Tabla 1 y Figura 1. La celulasa, cuando se suplementó con swollenina, aumentó la concentración de glucosa para los dos sustratos de madera blanda y rastrojo de maíz pretratado (PCS) en 24 horas. Bajo las mismas condiciones de carga de proteína total (20 mg), 10 mg de swollenina fueron sustancialmente capaces de reemplazar 10 mg de celulasa. La proteína de

control (BSA) no produjo el mismo efecto.

TABLA 1

Enzima (/g celulosa)	Glucosa (g/L)	
	madera blanda	PCS 7.2%
10mg celulasa	10.7	46
20 mg celulasa	13.6	51.9
10 mg celulasa + 10 mg swollenina	13.4	49
10 mg celulasa + 10 mg albúmina sérica bovina	11.4	45.5

Ejemplo 2: Selectividad del sustrato de swollenina

[0073] Carboximetilcelulosa (CMC), 1%; Solka Floc (una celulosa microcristalina pura, sintética), 1%; madera blanda (valor kappa = 0); madera blanda (valor kappa = 82); madera dura mezclada (kappa = 81); madera blanda (kappa = 80); y pulpa de desecho (kappa = 60); se examinaron con respecto a la producción mejorada de glucosa luego de la adición de swollenina. Cada sustrato celulósico en una cantidad equivalente a 0.1 g de celulosa se agregó a un vial de escintilación de vidrio de 20 mL para cada prueba. 5.0 mL de una solución que contenía 0.1 M de solución amortiguadora de citrato sódico (pH 4.8), 40 µL (400 µg) de tetraciclina y 30 mL (300 µg) de cicloheximida se agregaron a cada vial. Cada vial se llevó a un volumen total de 10 mL, menos la cantidad de enzima a agregarse en cada prueba, por la adición de agua destilada. Los contenidos de cada vial se llevaron a 50°C calentando en una incubador ajustado a 50°± 1 °C. A cada vial se agregó una composición entera de celulasa obtenida de *Trichoderma* (es decir, SPEZYME® CP, actividad específica = 3200-4110 IU/g; Genencor International, Inc., Palo Alto, CA, USA,) a una concentración final de celulasa de 20 mg de celulasa por g de celulosa. Adicionalmente, β-glucosidasa se agregó a una concentración final de 64 pNPG U/g de celulosa.

[0074] Swollenina semipurificada se agregó a una concentración final de 10 mg/g de celulosa (con referencia a Tabla 1). Al igual que antes, la swollenina se preparó, purificó y caracterizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Saloheimo *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:4202-11 (véase Ejemplo 5, *infra*). La concentración de la proteína swollenina se calculó por electroforesis en gel y fue aproximadamente de 2 mg/ml en ambas preparaciones.

[0075] Los viales se cerraron e incubaron con una suave rotación (180 RPM) a 50°C durante un período de 24 horas. Se tomó una alícuota para análisis. Los sólidos se extrajeron por centrifugación. El sobrenadante se sometió a análisis de glucosa empleando un analizador de glucosa YSI o un sistema HPLC Waters Alliance. Los resultados se muestran en Tabla 2 y Figuras 2A y 2B.

TABLA 2

Sustrato	Valor kappa	Glucosa (g/L)	
		sin swollenina	10 mg/g de swollenina
CMC	0	1	1.1
Solka Floka	0	4.7	5.4
Madera blanda	0	9.4	10.4
	82	2.4	5.1
	80	2.5	4.8
Madera dura	81	5	6.65
Pulpa de desecho	60	4.75	5.3

[0076] Comparado con un sustrato sintético tal como CMC o Solka Floka, se obtuvo un mayor beneficio de la presencia de swollenina usando un sustrato celulosico tal como pulpa de madera blanda o madera dura, como se evidencia por la observación de que se liberó más glucosa del sustrato. Este efecto es más pronunciado en un sustrato con alto contenido de lignina (v.g., pulpa de madera blanda, valor kappa = 82) que un sustrato con cero lignina (v.g., pulpa de madera blanda, kappa = 0). En consecuencia, la adición de swollenina puede ser más benéfica en el caso de un sustrato altamente recalcitrante, v.g., en donde el proceso de pretratamiento del sustrato no se ha optimizado, el contenido de lignina es elevado, y/o los enlaces de hidrógeno en el sustrato están aún intactos e ininterrumpidos.

Ejemplo3: Evaluación de swollenina sobre el desempeño hidrolítico de celulasa sobre la pulpa de madera blanda

[0077] Pulpa de madera blanda no blanqueada con un valor kappa de 82 se obtuvo de Smurft Facture (Biganos, FR). La pulpa no blanqueada se derivó mediante el proceso Kraft, se lavó y luego se secó con aire. Cada muestra se preparó para proporcionar una composición final que contenía 4% de celulosa (glucano) por peso seco en un volumen de 10 mL de mezcla de reacción. Se

agregaron enzimas al sustrato de muestra (como se indica en Tabla 2) en viales de escintilación de 20 mL a un volumen de líquido total de 10 mL, que incluía 50 mM de solución amortiguadora de citrato sódico (pH 4.8) y antibióticos (tetraciclina y ciclohexamida). Una composición entera de celulasa obtenida de *Trichoderma* (es decir, SPEZYME® CP, Genencor International, Inc., Palo Alto, CA, USA) se utilizó como fuente de celulasa en los experimentos de hidrólisis enzimática. La actividad específica de SPEZYME CP es 3200-4110 IU/g.

[0078] Las suspensiones se incubaron agitando suavemente (180 rpm) a 50°C durante 72 horas. El análisis de contenido de glucosa se llevó a cabo después de 24 y 72 horas siguiendo procedimientos estándar. Los resultados se muestran en Tabla 3 y Figura 3.

TABLA 3

Celulasa (mg/g celulosa)	Swollenina (mg/g celulosa)	Contenido de Swollenina	Glucosa (g/L)	
			24 h	72 h
30	0	0%	19.4	28.6
27	3	10%	21.6	29.8
24	6	20%	22.7	33.2
18	12	40%	21.4	31.5
12	18	60%	20.3	29.2
6	24	80%	15.1	22.6
0	30	100%	3	4

Ejemplo 4: Curva de dosificación de swollenina sobre sustratos de pulpa y papel

[0079] Se obtuvieron de Smurft Factice (Biganos, FR) dos muestras de pulpa de madera blanda no blanqueada. Una (designada "lignina alta") tenía un alto contenido de lignina (~15%) y un valor kappa (grado de lignificación) de 82. La segunda (designada "lignina baja") tenía un bajo contenido de lignina (~5%) y un valor kappa (grado de lignificación) de 12. La pulpa no blanqueada se derivó por el proceso Kraft, se lavó y luego se secó con aire. Se pesó cada muestra para obtener una composición final que contenía 4% de celulosa (glucano) por peso seco en un volumen de 10 mL de mezcla de reacción.

[0080] La pulpa de madera blanda empleada se pesó de modo que cada muestra contuviera exactamente 0.4 g de celulosa (glucano) por peso seco y se dosificó como se muestra en Tabla 3. Se agregaron las enzimas al sustrato de muestra en un vial de escintilación de 20 mL a un volumen líquido total de 10 mL, que incluía 50 mM de solución amortiguadora de citrato sódico (pH 4.8) y antibióticos (tetraciclina y ciclohexamida). Un complejo de enzima celulasa, producida de una cepa genéticamente modificada de *Trichoderma reesei* (es decir, Accellerase 1000™, Genencor), se usó como fuente de celulasa en los experimentos de hidrólisis enzimática. Se utilizó swollenina como una preparación purificada, al igual que antes, y como se describe en Ejemplo 5. Se calculó que la concentración de swollenina era aproximadamente 2 mg/ml mediante electroforesis en gel. Se sabe que el extracto purificado no tiene actividad celulasa. La carga sólida es 0.4 g de celulosa en volumen líquido total de 10 mL, dando una carga de 4% de celulosa (glucano).

[0081] La mezcla de reacción se incubó agitando suavemente (200 rpm) a 50°C

durante 72 horas. Los análisis de las concentraciones de glucosa y celobiosa se llevaron a cabo usando un sistema HPLC Waters (Alliance system, Waters Corp., Milford, MA). La columna HPLC usada para el análisis de azúcar se adquirió de BioRad (Aminex HPX-87H, BioRad Inc., Hercules, CA). Se midieron tanto la producción de glucosa como la de celobiosa. La digestión porcentual de celulosa (glucosa generada más celobiosa generada dividida por la celulosa de entrada) se resume en Tabla 4 y Figura 4. Bajo las mismas condiciones de carga de proteína total (30 mg), la swollenina fue esencialmente capaz de reemplazar 50% de la celulasa de Spezyme CP (Tabla 3). Suplementando ACCELLERASE con swollenina produjo un efecto benéfico usando sustratos con contenido bajo y alto de lignina (Tabla 4).

TABLA 4

Celulasa (mg /g celulosa)	Swollenina (mg/g celulosa)	% de digestión de celulosa	
		Lignina alta	Lignina baja
10	0	10.6	25.4
20	0	17.8	41.6
10	5	13.1	30.2
10	10	13.2	29.7
10	15	13.6	29.2
10	20	14.8	30.0
10	30	17.1	31.5

Ejemplo 5: Purificación de swollenina

[0082] Solución amortiguadora (50 mM Tris, pH 7.0) y cloruro de sodio (200 mM) se agregaron a 2 L del concentrado ultra-filtrado (UFC - *ultra-filtered concentrate*) de un cultivo de una cepa de *T. reesei* en la cual se eliminaron las cuatro principales celulasas (CBH1, CBH2, EG1 y EG2) y el gen de la swollenina se sobreexpresó bajo control del promotor *cbh1*, mezclando simultáneamente. Se ajustó el pH a pH 7.0. A esta mezcla se agregaron 50 mL de un agente de purificación de afinidad de dominio de unión a celulosa (CDB) (*es decir*, resina Cbind 200, Parte No. 70121, Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK), seguida por mezclado durante 1 hora. A continuación se filtró esta mezcla usando una unidad de filtrado de vidrio sinterizado y se recogió el material no adherido. La resina con swollenina adherida se lavó dos veces usando 2 L 50 mM Tris, pH 7.0 y 200 mM de cloruro de sodio. Se eluyó la swollenina de la resina mezclando la resina con la

swollenina adherida con agua MilliQ (2 L) durante 0.5 horas y filtrando luego la mezcla, usando la unidad de filtrado de vidrio sinterizado, en un recipiente de 2 L. Este proceso de elución con agua se repitió para asegurarse de que la swollenina se había eluido completamente.

[0083] El eluido se concentró usando un sistema de ultrafiltración con un valor de corte de 10K MW. El concentrado (800 mL) estaba listo para análisis y uso posterior. Se calculó que la concentración proteínica de swollenina aproximadamente 3 mg/ml por electroforesis en gel. Nótese que se sabe que el extracto prepurificado no tiene actividad celulasa significativa.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un método para incrementar la eficiencia de la hidrólisis de celulosa usando una celulasa, método conformado por:
 - (a) combinar un sustrato celulósico, una composición de celulasa y swollenina recombinante, y
 - (b) incubar el sustrato celulósico, la composición de celulasa y la swollenina bajo condiciones favorables para hidrólisis de celulosa,en donde la presencia de swollenina recombinante incrementa la eficiencia de la hidrólisis de celulosa por la composición de celulasa comparada con la obtenida usando la composición de celulasa en la ausencia de swollenina.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la composición de celulasa es una composición de celulasa entera.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la composición de celulasa es una composición de celulasa mezclada.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la composición de celulasa está constituida por una endoglucanasa, celobiohidrolasas y una β -glucosidasa.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la composición de celulasa está constituida por una o más celulasas primarias.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la composición de celulasa consiste esencialmente de una o más celulasas primarias.
7. El método de las reivindicaciones 5 o 6, en donde las celulasas primarias se seleccionan de CBH1, CBH2, EG1, EG2 y β -glucosidasa.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, realizado en la ausencia de enzimas accesorias distintas de swollenina.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, realizado en la ausencia de EG4 y CIP1.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, realizado en la ausencia de EG4 recombinante o CIP1 recombinante.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la

relación de celulosas en la composición de celulosa a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 20:1 y alrededor de 1:5.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la relación de celulosas en la composición de celulosa a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 10:1 y alrededor de 1:2.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde en donde la relación de celulosas en la composición de celulosa a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 5:1 y alrededor de 1:1.5.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la swollenina y las celulosas están presentes en una cantidad aproximadamente igual (wt:wt).

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el sustrato celulósico se selecciona del grupo conformado por madera, pulpa de madera, lodo de la fabricación de papel, corrientes de desecho de pulpa de papel, tablas de madera prensada, rastrojo de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, desecho de procesamiento de pulpa y papel, plantas leñosas o herbáceas, pastos, cascarilla de arroz, paja de algodón, tusas de maíz, granos de destilerías, hojas, paja de trigo, fibra de coco, pasto varilla y mezclas de los anteriores.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el sustrato celulósico es una madera blanda.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o 16, en donde el sustrato celulósico es un sustrato con alto contenido de lignina.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, 16, o 17, en donde el sustrato celulósico tiene un número kappa de 80 o más.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde el incremento porcentual en la eficiencia de celulosa es por lo menos alrededor de 10%.

20. Una composición de enzimas que está constituida por:

- (a) una composición de celulosa mezclada constituida a su vez por una endoglucanasa, celobiohidrolasas y una β -glucosidasa, y
- (b) una swollenina recombinante.

21. La composición de la reivindicación 20, en donde la composición no

incluye EG4 o CIP1.

22. La composición de la reivindicación 20, en donde la composición no incluye EG4 recombinante o CIP1 recombinante.

23. La composición de la reivindicación 20, en donde la composición no incluye EG4 recombinante y no incluye CIP1 recombinante.

24. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20-23, en donde la composición de celulasa mezclada consiste esencialmente de celulasas primarias.

25. Una composición de enzimas compuesta esencialmente de:

(a) una composición de celulasa mezclada que está constituida por una endoglucanasa, celobiohidrolasas y una β -glucosidasa, y

(b) una swollenina recombinante.

26. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde la relación de celulasas en la composición de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 20:1 y alrededor de 1:5.

27. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde la relación de celulasas en la composición de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 10:1 y alrededor de 1:2.

28. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde la relación de celulasas en la composición de celulasa mezclada a swollenina (wt:wt) está entre alrededor de 5:1 y alrededor de 1:1.5

29. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde la swollenina y las celulasas están presentes en una cantidad aproximadamente igual (wt:wt).

30. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde la cantidad de swollenina (wt:wt) en la composición reemplaza una cantidad aproximadamente igual de celulasas (wt:wt) en la composición, con respecto a la eficiencia de celulasa sobre un sustrato celulósico.

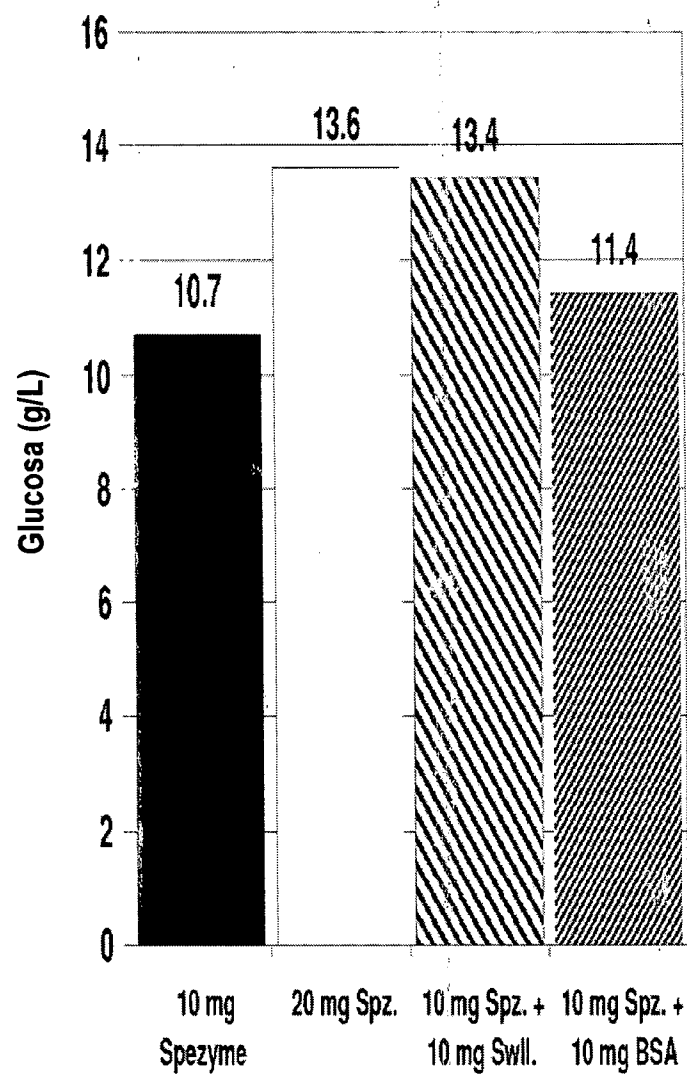


FIGURA 1

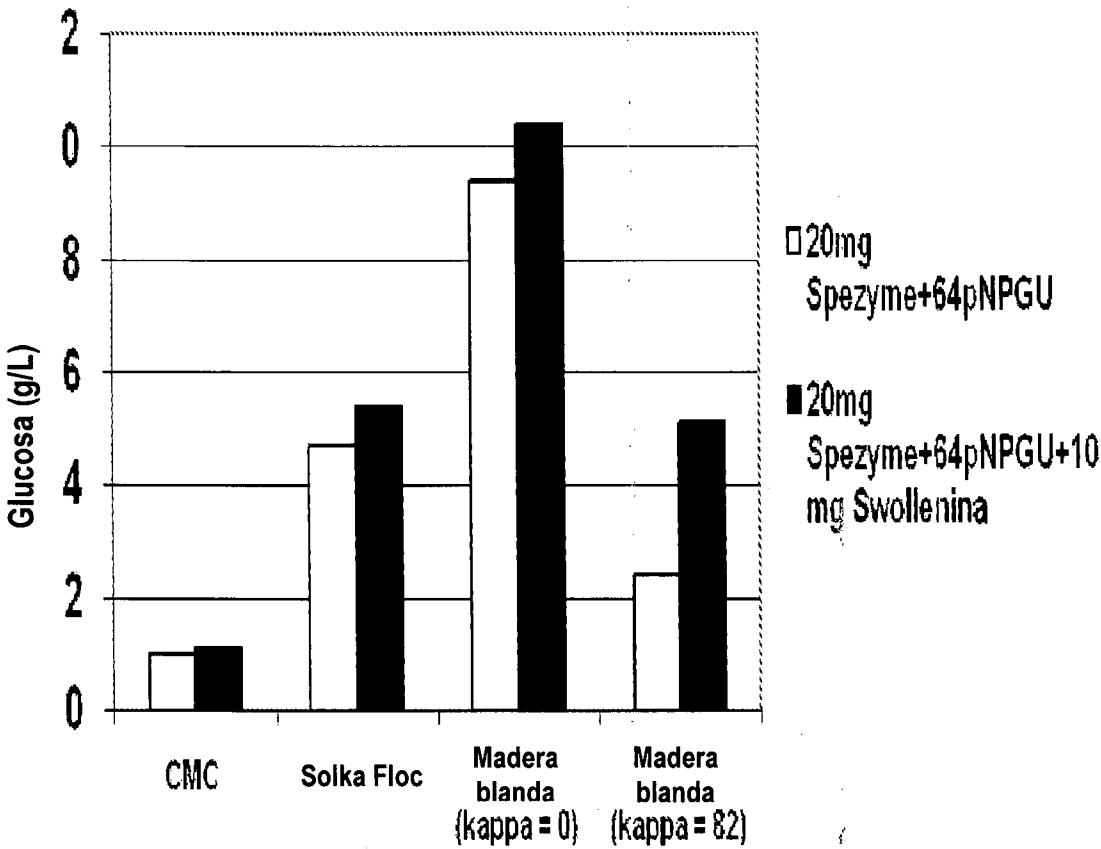


FIGURA 2A

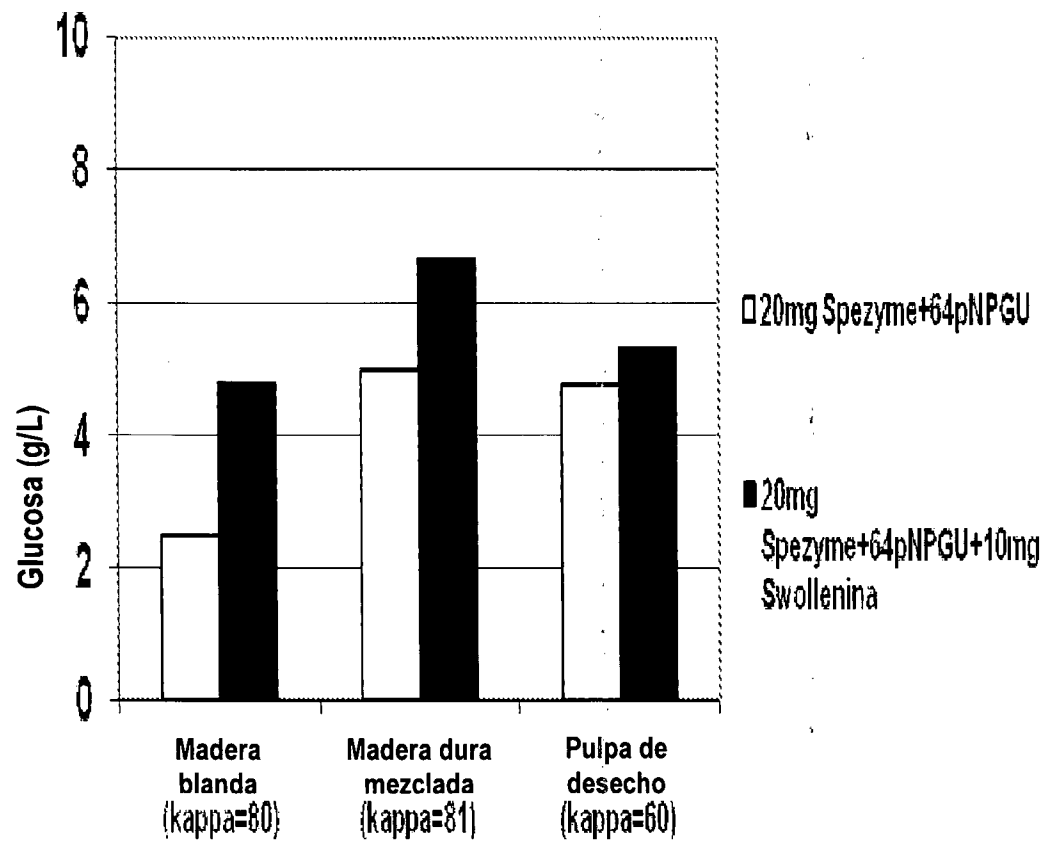


FIGURA 2B

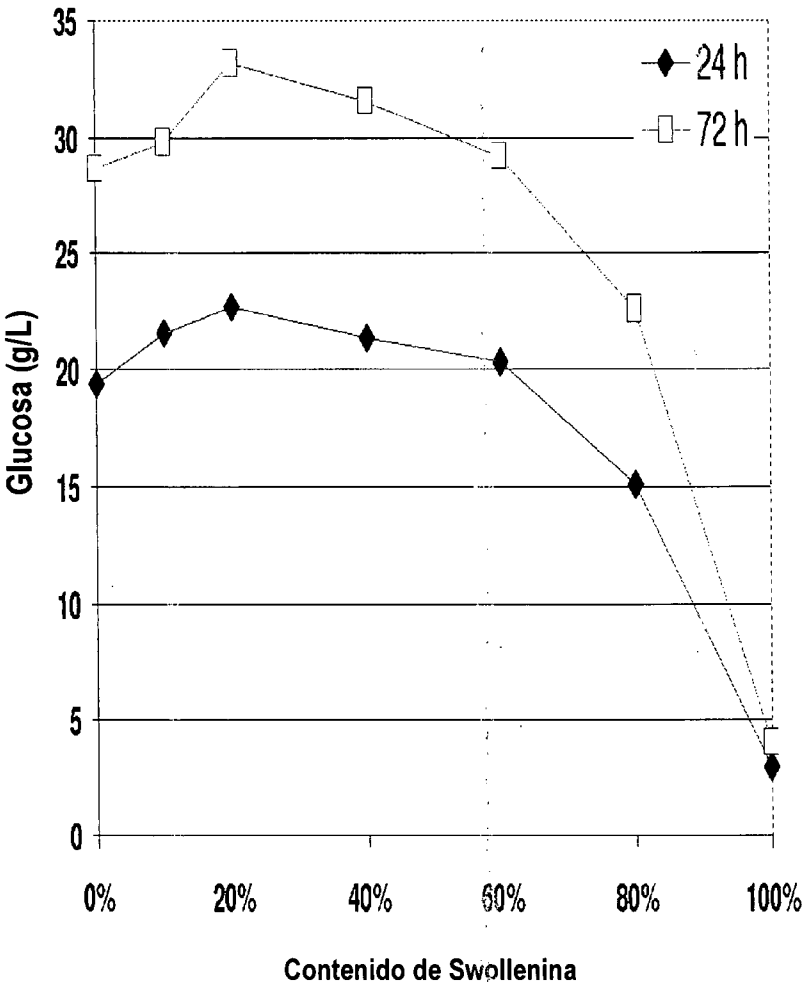


FIGURA 3

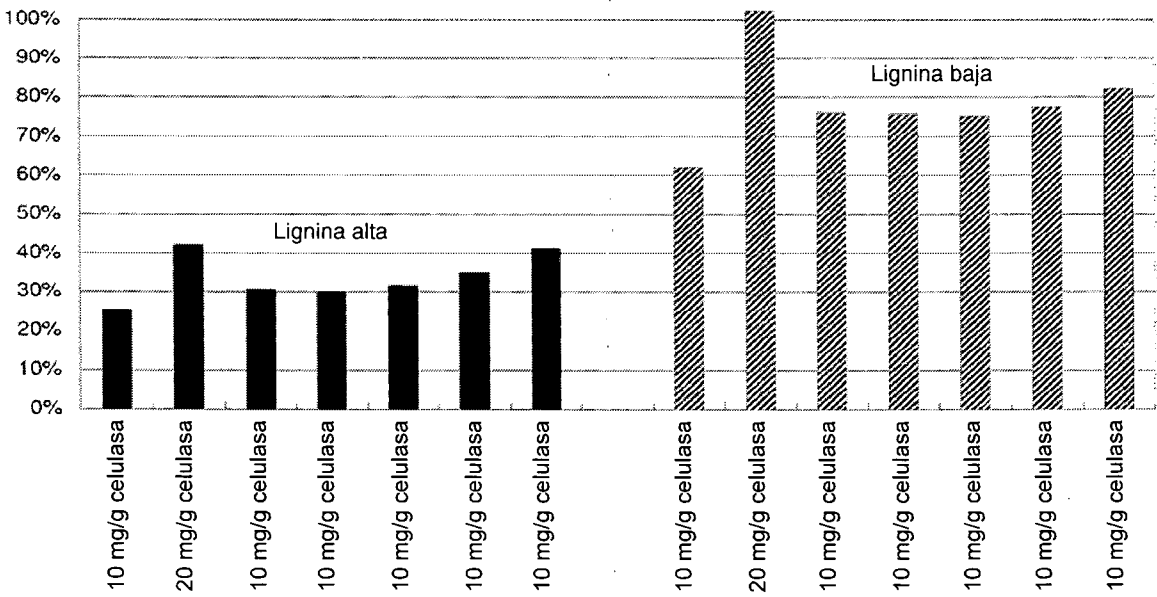


FIGURA 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-132157- -00000-0000

Fecha: 2010-10-25 16:29:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 69

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	LISTA DE CHEQUEO ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES
---	--

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	



Bogotá,
2020

91

Doctor(a)
CASTILLO BONILLA JERONIMO
Apoderado(a) y/o Representante de
DANISCO US INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 132157
	Solicitud internacional	PCT/US2009/042102
	Fecha inicio fase nacional	29/11/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	00595

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 ENE. 2011
adpall