



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-098752-00000-0000

Fecha: 2014-05-08 14:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 101

102

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE
BIOMASA LIGNOCELULÓSICA CON
AYUNO DE AZÚCAR SIMPLE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 1/14 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

71. SOLICITANTE C5-6 ITALY S.R.L.

DOMICILIO TORTONA (ALESSANDRIA)

74. APODERADO JESÚS M. MÉNDEZ

22. BOGOTÁ, D. C., MAYO 09 DE 2014.



No. 14-098752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-08 14:31:35
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 101

1
101

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/ EP2012/070340	Fecha 12.10.2012
Publicación Internacional No.		WO 2013/053924	Fecha 18.04.2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA CON AYUNO DE AZÚCAR SIMPLE			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12N 1/14 (2006.01); C12N 9/24 (2006.01); C12N 9/42 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE C5-6 ITALY S.R.L.	IDENTIFICACIÓN TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: Strada Savonesa 9, Frazione Rivalta Scrivia I-15057 Tortona (Alessandria) (IT) CIUDAD Tortona (Alessandria)		No. TELÉFONO - 6235828 CORREO ELECTRÓNICO - notificaciones@wolfmendez.com NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
DEPARTAMENTO/ESTADO			
PAÍS DE RESIDENCIA: Italia			
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS 1 VOLPATI, 2. RIVAS TORRES, 3. PARAVISI,		NOMBRES Laura Beatriz Stefano	NACIONALIDAD Italiana Italiana Italiano
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificaciones@wolfmendez.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA 1. Italia 2. Italia 3. Italia	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD Tortona (Alessandria) Genova Tortona (Alessandria)	DIRECCIÓN Via Palmiro Togliatti, 27/a 15057 Tortona (Alessandria) (Italia) Via Terrarossa 37 I-16011 Arenzano (Genova) (Italia) Via Palmiro Togliatti, 27/a 15057 Tortona (Alessandria) (Italia)
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS Méndez Bermúdez		NOMBRES Jesús M.	IDENTIFICACIÓN C.C.13.491.525 T.P.99.678
DIRECCIÓN	Calle 83 A No. 23 - 90	No. TELÉFONO	6235828
CIUDAD	Bogotá D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	notificaciones@wolfmendez.com
PAÍS	Colombia	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN 1. Italia		CÓDIGO PAÍS IT	(31) NÚMERO TO2011A000918	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2011/10/13
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		N°	Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
Jesús M. Méndez Bermúdez				
17	ANEXOS			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios:		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones:		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		
		Universidades públicas o privadas		
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación		
		Entidades sin ánimo de lucro		
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.		
		☐ Hoja de información complementaria.		
		☐ Otros, especificar		
		14. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención			FECHA DE PRESENTACIÓN Mayo 09 de 2014.	
☐ Patente de Modelo de Utilidad				
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
		C5-6 ITALY S.R.L.		
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2. Italia			Tortona (Alessandria) (IT)	Strada Savonesa 9, Frazione Rivalta Scrivia I-15057 Tortona (Alessandria) (IT)
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.6235828		6235828 Ext. 123	notificaciones@wolfmendez.com	Italia
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
1. VOLPATI,		Laura	Italiana	
2. RIVAS TORRES,		Beatriz	Italiana	
3. PARAVISI,		Stefano	Italiano	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
1. Via Palmiro Togliatti, 27/a 15057 Tortona (Alessandria) (Italia)		Tortona (Alessandria)		Italia
2. Via Terrarossa 37 I-16011 Arenzano (Genova) (Italia)		Genova		Italia
3. Via Palmiro Togliatti, 27/a 15057 Tortona (Alessandria) (Italia)		Tortona (Alessandria)		Italia
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4. Italia		IT	TO2011A000918	2011/10/13

CÓMO DILIGENCIAR EL PETITORIO PCT

Este formulario debe ser diligenciado únicamente por el (los) solicitante(s) que desea entrar en Colombia a la Fase Nacional en virtud del Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT).

1. TIPO DE SOLICITUD

Marcar en la casilla correspondiente si se trata de una solicitud internacional de Patente de Invención o de Patente de Modelo de Utilidad. Únicamente se acepta una opción por cada solicitud.

Indique si la solicitud se tramitó bajo el Capítulo I o el Capítulo II

2. DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT

Indique el número asignado como Solicitud Internacional por la Oficina receptora y la fecha de presentación de la solicitud. Además, indique el número y la fecha de la publicación internacional.

3. TÍTULO DE LA INVENCION

Defina en forma breve y precisa el nombre técnico de la invención que deberá ser congruente con las reivindicaciones y la descripción. El título no debe referirse a marcas ni nombres comerciales. Máximo 200 caracteres.

4. CIP (Clasificación Internacional de Patentes)

Indique las clasificaciones que aparecen en la publicación internacional.

5. SOLICITANTE (S)

Si existieran más solicitantes, utilícese las hojas de información complementaria.

- Apellidos o Razón Social.

En el caso de ser el solicitante una persona natural, indíquese los dos apellidos.

En el caso de ser el solicitante una persona jurídica indíquese la razón social completa de ésta.

- Nombre.

Llénese únicamente para personas naturales.

- Identificación.

Solo para solicitantes nacionales: Las personas naturales indicarán su C.C. (cédula de ciudadanía) y las personas jurídicas indicarán el NIT (Número de Identificación Tributaria).

- Tipo de solicitante.

Las personas jurídicas habrán de contestar con un dígito: [1] Microempresa: menos de 10 trabajadores, activos totales inferiores a 501 salarios mínimos legales vigentes. [2] Pequeña empresa. Entre 11 y 50 trabajadores, activos totales mayores a 501 y menores a 5.001 salarios mínimos mensuales vigentes. [3] Mediana empresa: personal entre 51 y 200 trabajadores, activos totales entre 5.001 y 15.000 salarios mínimos mensuales legales vigentes. [4] La empresa no es PYME. Si la persona jurídica no es empresa, indicar [5] Institución educativa (universidad, colegio, instituto, etc.). [6] Centro de investigación. [7] Si es persona natural.

6. DATOS DEL SOLICITANTE

Los datos indicados en esta sección, servirán para las posibles comunicaciones que la SIC realice, en caso de que la tramitación no se haga por intermedio de un representante o apoderado.

- Dirección, ciudad, departamento/estado/provincia y país de residencia.

Indíquese los datos completos de localización. Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI). En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.

- Nacionalidad.

Indíquese la nacionalidad del solicitante. En caso de ser una persona jurídica, indíquese el lugar de constitución.

Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI).

En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.

e-mail: Indicar claramente el correo electrónico con el fin de establecer comunicación.

7. INVENTORES

Indicar Apellidos, nombre y nacionalidad del inventor o inventores (deben ser personas naturales) en las casillas correspondientes. En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.

8. DATOS DE LOS INVENTORES

- Dirección, ciudad, departamento/estado/provincia y país de residencia.

Indicar los datos completos de localización. Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI).

9. REPRESENTANTE O APODERADO

Si la solicitud la presenta una persona natural sin apoderado, no debe diligenciarse esta sección.

Si la solicitud la presenta una persona jurídica sin apoderado, debe diligenciarse esta sección indicando el nombre del representante legal. Deberá anexarse el documento que acredite la existencia y representación legal.

Si la solicitud se presenta a través de apoderado, debe diligenciarse esta sección indicando el nombre del abogado que adelantará la actuación administrativa. Deberá anexarse el poder.

Número de Protocolo: En caso de haber presentado poder general y tiene un número de protocolo asignado por favor escribirlo.

10. DECLARACIÓN DE PRIORIDAD

Si el solicitante reclamó prioridad en la Solicitud Internacional indicar: País de origen.

Indique el país donde se presentó por primera vez la solicitud. Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI).

- Número.

Indique el número asignado a la solicitud en el país del que se reivindica prioridad.

- Fecha (AAAA/MM/DD).

Indique la fecha de solicitud en el país del que se reivindica prioridad.

En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.

11. DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Marcar "SI" cuando la invención fue desarrollada a partir de recursos genéticos o recursos biológicos de los que cualesquiera de los países miembros de la Comunidad Andina (Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú) es país de origen y anexar el contrato de acceso emitido por la Autoridad Nacional Competente (Ministerio del Medio Ambiente para Colombia).

12. DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Si la invención fue desarrollada usando conocimiento tradicional asociado a recursos genéticos o recursos biológicos de comunidades indígenas, afrodescendientes o locales de países miembros de la Comunidad Andina, debe anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional emitido por la comunidad.

14. COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO

Indique el número y fecha del recibo de pago de la tasa establecida o del pago electrónico. El comprobante de pago deberá anexarse.

15. FIRMA

Escribir el nombre completo y la firma de la persona que solicita la concesión de la patente.

Si se actúa a través de abogado la firma deberá ser la del apoderado; si actúa directamente una persona jurídica la firma deberá ser la del representante legal y si actúa directamente una persona natural ésta deberá firmar la solicitud.

16. RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

La documentación de la solicitud deberá presentarse en el orden que viene la relación de documentos, primero la documentación técnica y luego la documentación jurídica.

Señale en las casillas correspondientes a los documentos que acompañarán la solicitud e indíquese los números de folios y el número de reivindicaciones que correspondan.

OTROS : LISTADO DE SECUENCIAS

Si la solicitud contiene listado de secuencias aminoácidos y/o secuencias nucleótidos, estas deben suministrarse también en formato digital (CD o DVD con listado de secuencias en archivo de texto alfanumérico)

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO PATENTE DE INVENCION <u> X </u> PCT <u> X </u> MODELO DE UTILIDAD <u> </u> DISEÑO INDUSTRIAL <u> </u>	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: Mayo 09 de 2014. (51) Clasificación Internacional : C12N 1/14 (2006.01); C12N 9/24 (2006.01); C12N 9/42 (2006.01)	
(71) Solicitante (s): C5-6 ITALY S.R.L.	
(72) Inventor (es): 1. VOLPATI, Laura 2. RIVAS TORRES, Beatriz 3. PARAVISI, Stefano	
(74) Apoderado: JESUS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ	
(30) Prioridad: Si (31) TO2011A000918 32) 13.10.2011 (33) IT	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: Mayo 13 de 2014. (86) Datos relativos a la presentación de la PCT Fecha de presentación de la solicitud: Octubre 12 de 2012 (12.10.2012) No. de solicitud: PCT/EP2012/070340.	(87) Publicación internacional Fecha:(18.04.2013) No. Publicación: WO2013/053924
(54) Título: PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA CON AYUNO DE AZÚCAR SIMPLE	
(57) Resumen: Este descripción divulga un proceso para la producción de al menos una enzima a partir de una célula huésped para la hidrólisis de una primera biomasa lignocelulósica pretratada bajo condiciones de ayuno de azúcar simple, en donde el entorno de cultivo tiene muy pocos, o de preferencia nada, azúcares simples añadidos diferentes a los presentes en una biomasa lignocelulósica usada para alimentar y hacer crecer la célula huésped. El entorno de cultivo está sustancialmente nulo de estimuladores de fermentación e inductores de producción de enzimas. Preferentemente, el entorno de cultivo tiene un contenido alto de materia seca de la biomasa lignocelulósica pretratada.	

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT	
(21) No. De solicitud:	(51) int. Cl: C12N 1/14 (2006.01); C12N 9/24 (2006.01); C12N 9/42 (2006.01)	
(22) Fecha de solicitud: Mayo 09 de 2014.	(71) Solicitante: C5-6 ITALY S.R.L.	
(30) Prioridad: Si (31) No. Prioridad: TO2011A000918 (IT) (32) Fecha: 13 Octubre de 2011 (13.10.2011) (33) Pais: Italia (IT)	(72) Interventor (es): 1. VOLPATI, Laura 2. RIVAS TORRES, Beatriz 3. PARAVISI, Stefano (74) Apoderado (s): JESÚS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ	
(54) Título: PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA CON AYUNO DE AZÚCAR SIMPLE		
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT		
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional: Mayo 13 de 2014.	(87) Publicación internacional Fecha: (18.04.2013) Fecha (dd/mm/aa) No. Publicación: WO2013/053924	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha: Octubre 12 de 2012 (12.10.2012) No. de solicitud PCT: PCT/EP2012/070340.		

Resumen:

Este descripción divulga un proceso para la producción de al menos una enzima a partir de una célula huésped para la hidrólisis de una primera biomasa lignocelulósica pretratada bajo condiciones de ayuno de azúcar simple, en donde el entorno de cultivo tiene muy pocos, o de preferencia nada, azúcares simples añadidos diferentes a los presentes en una biomasa lignocelulósica usada para alimentar y hacer crecer la célula huésped. El entorno de cultivo está sustancialmente nulo de estimuladores de fermentación e inductores de producción de enzimas. Preferentemente, el entorno de cultivo tiene un contenido alto de materia seca de la biomasa lignocelulósica pretratada.

7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
PATENTE PCT	☒	MODELO DE UTILIDAD	☐	DISEÑO INDUSTRIAL	☐
SOLICITANTE/S, RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES		C5-6 ITALY S.R.L.			
DOMICILIO	Alessandria - Italia				
APODERADO	JESUS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ				
TITULO	PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA CON AYUNO DE AZÚCAR SIMPLE				
	CLASIFICACION				
EXPEDIENTE No.	FECHA DE SOLICITUD	Mayo 09 de 2014	ROLLO MICROFILM		
CERTIFICADO No.	FECHA DE CONCESION		VIGENCIA DESDE	HASTA	
PRORROGA					
TRASPASO A					
INVENTOR (ES)	VOLPATI, Laura				
	RIVAS TORRES, Beatriz				
	PARAVISI, Stefano				
OTROS					

Box No. VIII (iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America)
The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

**Declaration of inventorship (Rules 4.17(iv) and 51 bis.1(a)(iv))
for the purposes of the designation of the United States of America:**

I hereby declare that I believe I am the original inventor or an original joint inventor of a claimed invention in the application.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This declaration is directed to international application No. PCT/EP2012/070340 (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter).

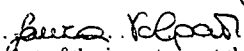
I hereby declare that the above-identified international application was made or authorized to be made by me.

I hereby acknowledge that any willful false statement made in this declaration is punishable under 18 U.S.C. 1001 by fine or imprisonment of not more than five (5) years, or both.

Name: VOLPATI, Laura

Residence: MILANO (Italy)
(city and either US state, if applicable, or country)

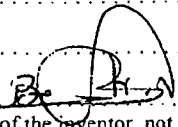
Mailing Address: Via Tagiura 23, I-20146 MILANO (Italy)

Inventor's Signature:  Date: 05.11.12
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: RIVAS TORRES, Beatriz

Residence: ARENZANO (Genova) Italy
(city and either US state, if applicable, or country)

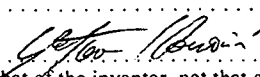
Mailing Address: Via Terrarossa 37, I-16011 ARENZANO (Genova) Italy

Inventor's Signature:  Date: 05.11.12
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

Name: PARAVISI, Stefano

Residence: URGNANO (Bergamo) Italy
(city and either US state, if applicable, or country)

Mailing Address: Via dei Ronchi 78, I-24059 URGNANO (Bergamo) Italy

Inventor's Signature:  Date: 05.11.12
(The signature must be that of the inventor, not that of the agent)

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iv)".

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA
CON AYUNO DE AZÚCAR SIMPLE**

ANTECEDENTES

5

10

15

20

25

30

Es sabido que la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa a partir de materias primas lignocelulócidas requiere de una mezcla bien balanceada de enzimas que consisten de endoglucanasas, celobiohidrolasas, β -glucosidasas, xilanasas, manasas y varias enzimas que actúan en las cadenas laterales de xilanos y mananos. La producción de enzimas es un paso importante en el proceso de biomasa a etanol como producción de enzimas o mezcla de enzimas y las aplicaciones están actualmente entre los pasos de procesamiento más costosos para las vías de base biológica para la utilización del material lignocelulósico.

Los sistemas de enzimas del hongo degradante de plantas *Trichoderma reesei* son los más extensamente investigados y se cree que son los organismos más ampliamente usados para obtener las mezclas de enzima comerciales. El *T. reesei* produce numerosas enzimas degradantes de celulosa y hemicelulosa aún si la secreción extracelular de β -glucosidasa es baja. Como es bien sabido que el contenido activo de la β -glucosidasa es crítico para obtener una alta conversión de celulosa, la solución de enzimas de *T. reesei* es comúnmente complementada con β -glucosidasas para obtener una solución de enzimas bien balanceada y más avance en la hidrólisis de la celulosa. En otros casos, las soluciones de enzima comercial o de mezcla de enzima comercial

también se podrían obtener usando enzimas producidas por otros hongos buenos productores de β -glucosidasa.

Aún cuando no se ha reportado que haya una clara relación entre el sustrato usado para cultivo y el
5 rendimiento hidrológico de las enzimas resultantes sobre los sustratos particulares en estudios previos sobre el *T. reesei* Rut C30 (Ver Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. (2 Characterization of enzyme or enzyme mixtures produced by *Trichoderma reesei*
10 on various carbon sources. *Process Biochem*, 40, 3519-3525) o *Penicillium brasilianum*, (Ver Jorgensen, H., Olsson, L. (2 Production of enzyme or enzyme mixtures by *Penicillium brasilianum* IBT 20888: Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme Microb Technol*, 38,
15 381-390) muchos grupos de investigación han tratado de producir enzimas o mezclas de enzimas usando de alguna manera el mismo material usado para la producción de bio-etanol para reducir los costos finales de la mezcla de enzima.

20 Uno de dichos procesos se describe en WO 2007005918. Este proceso añade el sustrato lignocelulósico pretratado descrito como un inductor del crecimiento de enzimas, mientras que usa la adición constante de glucosa como el alimento para el crecimiento
25 del organismo. El propósito dictado de esta tecnología es el de reemplazar la celulosa pura usada hoy en día para la producción de enzimas o mezcla de enzimas en una célula huésped, con material lignocelulósico pretratado, tal como, *Arundo Donax* (PCS) especialmente pretratado,
30 como se describe en WO 2007005918. La ventaja de esto es que el costo de producción se reduce debido al uso de un

inductor (biomasa lignocelulósica) que está fácilmente disponible y por lo tanto es más barata que la celulosa pura. Como un inductor, WO 2007005918 usa una pequeña cantidad de biomasa y añade continuamente glucosa para
5 alimentar al organismo.

Aún al usar la biomasa lignocelulósica como un inductor, el costo de las enzimas permanece alto y es un factor clave que limita la difusión de las tecnologías enzimáticas. Los factores principales que limitan la
10 reducción del costo de las enzimas se representan por el costo de los ingredientes usados para promover el crecimiento del microorganismo y los costos de operaiación. Entre los ingredientes, los costos principales se representan por la glucosa, estimuladores de fermentación
15 tales como sales de vitaminas y minerales, e inductores de la producción de enzimas, tales como lactosa e isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG). Los estimuladores de fermentación y los inductores de la producción de enzimas son costosos aún cuando se usan en
20 pequeñas cantidades. En cuanto a los costos de operación, la energía necesaria para agitar el medio de fermentación y el tiempo total de fermentación deben ser considerados.

Por lo tanto, existe una necesidad por un proceso no costoso para la producción de una enzima o
25 mezcla de enzima.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta descripción divulga un proceso para la
30 producción de al menos una enzima a partir de una célula huésped para la hidrólisis de una primera biomasa

lignocelulósica pretratada en donde dicho proceso comprende los pasos de cultivar la célula huésped que es capaz de producir la al menos una enzima durante un tiempo de cultivación, en donde la cultivación de la
5 célula huésped se da en un entorno de cultivación que comprende la célula huésped, una segunda biomasa lignocelulósica pretratada, dicha segunda biomasa lignocelulósica pretratada, dicha segunda biomasa lignocelulósica pretratada está compuesta de azúcares
10 complejos y opcionalmente azúcares simples; el cultivo se hace bajo condiciones de ayuno de azúcar simple que tienen un azúcar simple opcionalmente añadido en el rango de 0 a 10% por peso del entorno de cultivación en una base seca para al menos una porción del tiempo de
15 cultivo; y el entorno de cultivo está sustancialmente libre de vitaminas añadidas y/o minerales añadidos y/o inductores de producción de enzimas añadidos.

También se divulga que el contenido de materia seca por peso de la segunda biomasa lignocelulósica
20 pretratada en el entorno de cultivo puede ser mayor al 2%, preferentemente mayor al 4%, más preferentemente mayor al 6%, aún más preferentemente mayor al 8%, aún más preferentemente mayor al 10%, aún más preferentemente mayor al 15%.

25 Además se divulga que la porción del tiempo de cultivo bajo condiciones de ayuno de azúcar simple puede ser seleccionada del grupo que consiste de al menos el 50% del tiempo de cultivo, al menos el 75% del tiempo de cultivo, al menos el 85% del tiempo de cultivo, al menos
30 el 90% del tiempo de cultivo, al menos el 98% del tiempo de cultivo, y un periodo igual al tiempo de cultivo.

Además se divulga que el azúcar simple añadido opcional puede estar en un rango seleccionado del grupo que consiste de 0 a 5% por peso del entorno de cultivo en una base seca, 0 a 2.5% por peso del entorno de cultivo en una base seca, 0 a 2.0% por peso del entorno de cultivo en una base seca, 0 a 1.0% por peso del entorno de cultivo en una base seca y ningún azúcar simple opcional.

Además se divulga que la enzima o mezcla de enzimas puede ser cosechada al remover la enzima o mezcla de enzima del entorno de cultivo y que se puede usar aún más para hidrolizar la primera biomasa lignocelulósica y la primera biomasa lignocélulosica y la segunda biomasa lignocelulósica pretratada, ambas comprendiendo la biomasa lignocelulósica derivada del grupo que consiste en el mismo género de hierba o más preferentemente la misma especie de hierba.

También se divulga que hay una enzima producida, una biomasa lignocelulósica hidrolizada por la enzima o mezcla de enzimas producida bajo condiciones de ayuno de azúcar simple.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se ha descubierto un proceso para la producción de una enzima o mezcla de enzimas a partir de una célula huésped mediante el cultivo de la célula huésped en un entorno DE cultivo mínimo, lo que demuestra un método para la producción de enzimas a un bajo costo.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se ha descubierto que la actividad en un material de biomasa

lignocelulósica pretratada de una mezcla de enzima o enzima producida a partir de una célula huésped se puede mejorar cuando los azúcares simples tales como glucosa y xilosa usadas tradicionalmente para alimentar células huésped se reemplazan con el material lignocelulósico pretratado, tales como, *Arundo Donax* pretratado. El material lignocelulósico pretratado se pretrata preferiblemente por remojo y lavado en agua caliente y presionando para eliminar los compuestos solubles en agua y de agua. El pretratamiento de remojo elimina los monómeros de azúcar solubles (xilosa y glucosa). Además de mejorar la actividad de la enzima producida, el material lignocelulósico pretratado es significativamente menos caro que las fuentes de glucosa y de xilosa utilizadas tradicionalmente para la alimentación de las células huésped. Por otra parte, se obtiene una reducción significativa de tiempo, cuando se utiliza el material lignocelulósico pretratado como la fuente de carbono única, y ninguno o pocos azúcares simples añadidos se añaden al entorno de cultivo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se ha descubierto que el cultivo de la célula huésped que produce la mezcla de enzima o enzima no requiere la adición de estimuladores de fermentación caros, tales como vitaminas y minerales o sales minerales, y/o añadir inductores de producción de enzima, tales como lactosa e ITPG, de ese modo el entorno de cultivo que comprende el material lignocelulósico pretratado es nulo o sustancialmente nulo, de estimuladores de fermentación añadidos e inductores adicionales de la producción de enzimas. En la presente descripción, por la expresión "sustancialmente nulo de estimuladores de fermentación

añadidos" se quiere decir que la concentración en el entorno de cultivo de cada estimulador de fermentación añadido (tanto de vitaminas como de minerales) es de menos de 1g/l, más preferiblemente menos de 500 mg/l, incluso más
5 preferiblemente menos de 200 mg/l, aún incluso más preferiblemente menos de 100mg/l, todavía incluso más preferiblemente menos de 50 mg/l, aún incluso más preferiblemente menos de 10mg/l, todavía incluso más preferiblemente menos de 5 mg/l, más preferiblemente menos
10 de 2 mg/l. Estos valores de concentración son significativamente menos de los valores de concentración normalmente usados en procesos similares conocidos en la técnica. En la presente descripción, por la expresión "sustancialmente nulo de inductores de producción de enzima
15 añadidos", se quiere decir que la concentración en el medio de cultivo de cada uno de los inductores adicionales de la producción de enzimas (tanto lactosa como IPTG) es de menos de 100 mg/l, más preferiblemente menos de 50 mg/l, incluso más preferiblemente menos de 20 mg/l, aún incluso más
20 preferiblemente menos de 10MG/l, más preferiblemente menor que 5 mg/l. Estos valores de concentración son significativamente menos de los valores de concentración normalmente usados en procesos similares conocidos en la técnica.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se ha descubierto que el cultivo de la célula huésped productor de la mezcla de enzima o enzima puede producirse en un entorno de cultivo que tiene un contenido de materia seca en peso del material lignocelulósico
30 pretratado sustancialmente mayor que el método descrito anteriormente. El contenido de materia seca en peso del

material lignocelulósico pretratado en un ambiente de cultivo podrá ser superior a 2 %, preferiblemente superior a 4 %, más preferiblemente mayor que 6 %, incluso más preferiblemente mayor que 8 %, aún incluso más preferiblemente mayor que 10 %, más preferiblemente superior al 15 %. El aumento en el contenido de materia seca reduce la energía por gramo del entorno de cultivo requerido para agitar el entorno de cultivo, con respecto a los procesos descritos previamente. Más aún, la cantidad de entorno de cultivo necesaria para la producción de una cierta cantidad de enzimas se reduce, y correspondientemente el volumen del equipo (bioreactor), generando de este modo una reducción adicional de los costos de inversión.

Una ventaja adicional de la invención es que la mezcla de enzimas procedentes de la célula huésped es más reactiva que el material lignocelulósico pretratado utilizado para alimentar y hacer crecer la célula huésped cuando la mezcla de enzima se utiliza para hidrolizar materiales lignocelulósicos pretratados similares.

Una persona experta en la técnica apreciará que las características del procedimiento descrito reducen significativamente el costo de la producción de enzimas.

PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

Es bien conocida en la técnica la producción de la enzima o mezcla de enzimas en una célula huésped de origen fúngico, tales como hongos filamentosos, o el origen de bacterias. El proceso de crecimiento de la invención puede ser un proceso bien conocido, excepto que la

alimentación, tales como glucosa pura, se limita y la alimentación primaria es material lignocelulósico pretratado.

Los procedimientos de producción de enzimas son bien conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención la mezcla de enzima o enzima es preferiblemente una enzima extracelular o la mezcla de la enzima secretada en el medio de fermentación por la célula huésped. Alternativamente, la mezcla de enzima o enzima es intracelular.

Una célula huésped capaz de producir la enzima o mezcla de enzimas se cultiva en condiciones culturales precisas a una tasa de crecimiento particular. Cuando el cultivo de células huésped introduce en el medio de fermentación del cultivo inoculado pasa a través de una serie de etapas. Inicialmente no se produce crecimiento. Este periodo se conoce como la fase de latencia y puede ser considerado un período de adaptación. Durante la siguiente fase, que se conoce como la "fase exponencial", la tasa de crecimiento del cultivo de la célula huésped se incrementa gradualmente. Después de un período de máximo crecimiento, la tasa cesa y el cultivo entra en fase estacionaria. Después de un período adicional de tiempo el cultivo entra en la fase de muerte y el número de células viables disminuye. Cuando, en la fase de crecimiento, la mezcla de enzimas o enzima de interés es expresada, depende de la enzima de interés y la célula huésped. La mezcla de enzima o enzima puede, en una modalidad, expresarse en la fase exponencial. En otra modalidad, la mezcla de enzima o enzima puede ser producida en la fase de transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria. La mezcla de

enzima o enzima puede también, en otra modalidad, expresada en la fase estacionaria y/o justo antes de la esporulación. La mezcla de enzima o enzima puede, de acuerdo con la invención, también producirse en más de una de las fases
5 antes mencionadas.

En otras palabras, de acuerdo con la invención, la célula huésped se cultiva en un medio adecuado y en condiciones que permitan que al menos una enzima o una mezcla de enzimas se expresen, preferiblemente secretada y
10 opcionalmente recuperadas. Si bien como se señaló anteriormente, el crecimiento de la célula huésped tiene muchas fases técnicas, para los fines de esta descripción, estas fases se agrupan en el plazo de cultivo. El cultivo de la célula huésped tiene lugar en un medio de
15 fermentación que comprende una fuente de carbono y un material lignocelulósico pretratado como alimento. De acuerdo con una modalidad preferida, el material lignocelulósico pretratado ha sido pretratado por ser empapado/lavado y luego explotado por vapor como se
20 describe en el documento WO 2010113129, cuyas enseñanzas se incorporan por referencia.

Después de la fermentación, la mezcla de enzima o enzima puede ser recuperada opcionalmente usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la enzima
25 extracelular o recuperación de mezcla de enzima a partir del medio de fermentación se puede hacer utilizando procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitados a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. Los
30 procedimientos para la recuperación de una enzima o mezcla de enzima intracelular también son bien conocidos en la

técnica.

Al menos en el contexto de la presente invención los términos intercambiables "cultivo" y "fermentación" se refieren a cualquier proceso de producción de una mezcla de
5 enzimas o enzima que utiliza un cultivo de masa que consta de una o más células huésped. La presente invención es útil para la producción a escala industrial, especialmente, por ejemplo, que tiene un medio de cultivo de al menos 50 litros, preferiblemente al menos 1 litro, más
10 preferiblemente al menos 5 litros.

La enzima o mezcla de enzima puede incluir, pero no está limitado a cualquiera de los pertenecientes al grupo de la enzima o mezcla de enzimas que comprende endoglucanasas (endo-1, 4- β -D-glucanasa), celobiohidrolasas
15 o exoglucanasas. Un procedimiento de la invención se puede realizar como un proceso por lotes, un lote alimentado, una alimentación por lotes repetida o un proceso continuo.

Un procedimiento de la invención puede llevarse a cabo aeróbicamente o anaeróbicamente. Algunas enzimas se
20 producen por cultivo sumergido y algunas por el cultivo de superficie. Se prefiere el cultivo sumergido de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, la invención se refiere a procesos de producción de una mezcla
25 de enzima o enzima en una célula huésped que comprende el cultivo de dicha célula huésped capaz de producir la enzima o mezcla de enzimas en condiciones propicias para la producción de una enzima o mezcla de enzimas, tal como la enzima o mezcla de enzimas, en el que el material
30 lignocelulósico pretratado se utiliza para hacer crecer la célula huésped bajo condiciones de ayuno de azúcar simple.

Más específicamente, el proceso descrito produce al menos una enzima de una célula huésped para la hidrólisis de una primera biomasa lignocelulósica pretratada en el que dicho procedimiento comprende las etapas de primero cultivar la célula huésped que es capaz de producir la al menos una enzima durante un tiempo de cultivo, en el que el cultivo de la célula huésped se produce en un entorno que comprende el cultivo de la célula huésped, una segunda biomasa lignocelulósica pretratada, dicha segundo biomasa lignocelulósica pretratada compuesta de azúcares complejos, azúcares y opcionalmente simples; y el cultivo se realiza durante al menos una parte del tiempo de cultivo en condiciones de ayuno de azúcar simple en el que el entorno de cultivo puede comprender además un azúcar simple añadido opcional en el rango de 0 a 10 % en peso del entorno de cultivo sobre una base seca.

El tiempo de cultivo es la cantidad de tiempo medido desde la adición del volumen de pre-cultivo para acoger el entorno de cultivo celular para la recolección, retirada, o separación de la enzima o mezcla de enzimas del ambiente de cultivo. En el caso de múltiples remociones, el tiempo de cultivo termina en el momento en que la primera mezcla de enzima o enzima se recolecta del medio de cultivo.

Los azúcares complejos son los azúcares que no son azúcares monoméricos. Los azúcares simples son los azúcares monoméricos, y pueden ser seleccionados del grupo que consiste en glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa y fructosa. Cabe señalar que puede haber otros azúcares simples que no están en la lista anterior.

La cantidad de biomasa lignocelulósica presente

en el entorno de cultivo debe ser suficiente para el crecimiento de la célula huésped para producir la cantidad deseada de enzima o mezcla de enzimas.

La frase condiciones de ayuno de azúcar simple
5 significa generalmente que más del 50 % en peso de la alimentación de la célula huésped es de la biomasa lignocelulósica pretratada y no a partir de azúcares simples añadidos. Una condición de ayuno de azúcar simple a modo de ejemplo es cuando la cantidad de azúcares simples
10 opcionales añadidos al proceso, en su caso, en caso de que se añadan, está en el rango de 0 a 10 % en peso del entorno el cultivo sobre una base seca. Más preferiblemente, los azúcares simples opcionales añadidos deben estar en el rango de 0 a 5 % en peso del entorno el cultivo sobre una
15 base seca, 0 a 2.5 % en peso siendo aún más preferido, con 0 hasta 2.0% siendo el más preferido (en caso de que se añadan azúcares simples). En el mejor de los casos, no hay azúcares simples añadidos, que es la condición perfecta de ayuno de azúcar simple. Además, la frase azúcares simples
20 añadidos significa que podría haber uno o más azúcares simples añadidos.

La presencia de los azúcares simples opcionales añadidos también se puede expresar como la relación de la cantidad de los azúcares simples opcionales añadidos a la
25 cantidad de azúcares a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada. La relación más preferida es 0.0, que es la ausencia de cualquier azúcar simple opcional. Sin embargo, la relación debe ser preferiblemente menor que 2.0 o 1.5, menos de 1.12 siendo más preferido, menos de 0.53 siendo
30 aún más preferido y menos de 0.33 siendo también un valor preferido. En una modalidad, el azúcar simple opcional está

presente, pero a menos que el porcentaje indicado o presente sea menos de la relación de mezcla indicada.

Las condiciones de ayuno de azúcar simple deben mantenerse por lo menos durante una parte del tiempo de cultivo. Expresado cuantitativamente, las condiciones de ayuno de azúcar simple deben mantenerse durante por lo menos 50 % del tiempo de cultivo, 75 % siendo más preferido, 85 % siendo aún más preferido, 95 % siendo aún incluso más preferido, 99 y 100 % siendo el tiempo de cultivo más preferido. 100 % del tiempo de cultivo es cuando la al menos una porción del tiempo de cultivo es igual al tiempo de cultivo.

De esta manera, el crecimiento de la célula huésped y de sus enzimas están influenciados por la alimentación de la biomasa lignocelulósica pretratada de la segunda biomasa lignocelulósica y se adaptan en el tiempo para hidrolizar mejor la biomasa lignocelulósica pretratada. De esta manera, cuando la mezcla de enzima se utiliza para hidrolizar una biomasa lignocelulósica, especialmente una biomasa lignocelulósica pretratada que tiene una composición similar a la segunda biomasa lignocelulósica pretratada alimentada, hay más reactividad (es decir, mejor hidrólisis enzimática) a la biomasa lignocelulósica pretratada.

25

SUSTRATO Y ADITIVOS

El sustrato utilizado en un proceso de la invención puede ser cualquier sustrato conocido en la técnica. Los sustratos adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según

30

composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la *American Type Culture Collection*).

Los sustratos fuente de carbono comúnmente utilizados como alimentación para la producción de la
5 enzima o mezcla de enzimas incluye glucosa o azúcares similares, siempre que su consumo relativo al consumo de los azúcares complejos es dentro de los límites especificados. Sustratos fuente de nitrógeno tales nos amoniaco (NH_4Cl) o urea, se pueden añadir para mejorar el
10 cultivo y la producción de la enzima o mezcla de enzimas. Una característica clave del procedimiento descrito es que no hay estimuladores de fermentación, con la excepción de los ya comprendido en el material lignocelulósico pretratado, se añaden al entorno de cultivo, o se añaden en
15 una pequeña cantidad, que es el ambiente de cultivación no comprende estimuladores de fermentación añadido o comprende estimuladores de fermentación añadido en cantidad menor con respecto a los procesos previamente conocidos. En el contexto de la presente descripción, se añadieron
20 estimuladores de fermentación para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Las vitaminas que no se añaden o se añaden en pequeña cantidad se seleccionan del grupo que consiste de: biotina, pantotenato, ácido nicotínico, mesoinositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, riboflavina, y vitaminas A, B,
25 C, D, y E. Los minerales que no se han agregado o añadido en una pequeña cantidad son los minerales y sales minerales que proporcionan nutrientes seleccionados del grupo que consiste en: B, P, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, Co, Mo y Cu.

30 Una característica clave del procedimiento descrito es que no hay inductores de la producción de la

enzima, con la excepción de los ya comprendidos en el material lignocelulósico pretratado, que se añadan al entorno de cultivo, o se añadan en una pequeña cantidad, es decir el entorno de cultivo no comprende inductores
5 adicionales de la producción de enzimas o comprende inductores de la producción de la enzima añadido en cantidad menor con respecto a los procesos previamente conocidos. En el contexto de la presente descripción, los inductores de la producción de enzimas que no se añaden o
10 se añaden en una pequeña cantidad para el entorno el cultivo se seleccionan del grupo que consiste en lactosa e ITPG.

La celulosa pura, que generalmente se usa como un inductor (y fuente de carbono) en los procesos de
15 producción de enzima o mezcla de enzimas, se sustituye con el material lignocelulósico pretratado, preferiblemente ácido pretratado destoxificado, tal como lavado, material lignocelulósico pretratado.

El material lignocelulósico pretratado es una
20 fuente de carbono y puede ser añadido al medio de cultivo junto con una fuente de carbono, pero también puede ser añadido por separado de la fuente de carbono. De acuerdo con la invención, el material lignocelulósico pretratado se puede añadir al medio de cultivo, ya sea antes de la
25 inoculación, simultáneamente con o después de la inoculación del cultivo de células huésped en una cantidad al menos equivalente a la cantidad de azúcares complejos disponibles necesarios para el crecimiento de la célula huésped. Cuando se agrega biomasa lignocelulósica durante
30 el tiempo de cultivo, un nuevo cálculo de la cantidad de azúcares simples opcionales se agregan o se hace la

proporción de azúcares simples opcional a la biomasa lignocelulósica. Mientras que la cantidad de azúcares simples puede no haber sido lo suficientemente baja durante la parte inicial del tiempo de cultivo, mediante la adición
5 de biomasa lignocelulósica al entorno de cultivo, la cantidad de azúcares simples facultativos añadidos caería dentro de los rangos especificados, por lo menos durante el tiempo restante en el tiempo de cultivo.

Una persona experta en la técnica puede
10 determinar fácilmente cuándo y qué cantidad de material lignocelulósico pretratado agregar durante un proceso de producción de la enzima o mezcla de enzimas de la invención. Durante el lapso de tiempo de cultivo, el material lignocelulósico pretratado se añade
15 preferentemente en cantidades correspondientes a la actividad de la glucosa consumida normalmente por la célula huésped y se mantiene dentro de los límites especificados anteriormente.

Como se mencionó anteriormente, el material
20 lignocelulósico pretratado se utiliza de la misma forma que la glucosa se utiliza normalmente en los procesos de producción de enzima o mezcla de enzimas bien conocidos.

Por ejemplo, cuando la producción de la enzima o mezcla de enzimas usando una cepa de *Penicillium*, tal como
25 *Penicillium decumbens*, como la célula huésped, los glucanos y xilanos como están presentes en el material lignocelulósico pretratado se cargan a un nivel de 2.7 gramos totales/L. Un procedimiento de la invención puede durar el mismo período de tiempo que un proceso tradicional
30 correspondiente, por ejemplo, entre 3 y 10 días. Las fermentaciones de *Penicillium*, incluyendo fermentaciones de

Penicillium decumbens, en general duran entre 3-9 días.

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

5 De acuerdo con la invención "material lignocelulósico" incluye cualquier material que comprende lignocelulosa. La lignocelulosa generalmente se encuentra, por ejemplo, en los tallos, hojas, cáscaras, vainas y mazorcas de las plantas o las hojas, las ramas y la madera
10 de los árboles. El material lignocelulósico también puede ser, pero no está limitado a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos urbanos, residuos de papel y residuos de pulpa y fábricas de papel. Se entiende aquí que el material lignocelulósico puede ser
15 en forma de material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mixta.

En una modalidad, el material lignocelulósico es fibra de maíz, paja de arroz, madera de pino, astillas de madera, álamo, paja de trigo, hierba varilla, bagazo,
20 *Arundo donax*, *myscanthus*, eucalipto, bambú, papel y desechos de la elaboración de pulpa. En una modalidad preferida, el material lignocelulósico es *Arundo Donax*. En otra modalidad preferida, el material lignocelulósico es plantas leñosas o herbáceas seleccionadas del grupo que
25 consiste de las gramíneas. Alternativamente enunciado, la biomasa lignocelulósica preferida se selecciona del grupo que consiste de las plantas pertenecientes a la familia *Poaceae* o *Gramineae*. El papel de almidón puede estar presente pero en cantidades de origen natural. La biomasa
30 lignocelulósica tiene preferiblemente menos de 70 % en peso seco, con menos de 50 % de almidón en peso seco siendo más

preferido, y menos de 25 % en peso seco siendo el más preferido.

PRETRATAMIENTO

5

De acuerdo con la invención, el material lignocelulósico es pretratado. El término "pretratado" puede ser sustituido por el término "tratado". Sin embargo, las técnicas preferidas contempladas son aquellas bien conocidas para el "pretratamiento" del material lignocelulósico como se describirá más adelante.

Como se mencionó anteriormente el tratamiento o pretratamiento puede llevarse a cabo utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica, que promueven la separación y/o la liberación de la celulosa y el aumento de la accesibilidad de la celulosa a partir de material lignocelulósico.

Las técnicas de pretratamiento son bien conocidas en la técnica e incluyen pretratamiento biológico, físico y químico, o cualquier combinación de los mismos. En modalidades preferidas, el pretratamiento del material lignocelulósico se lleva a cabo como un proceso continuo o discontinuo.

Las técnicas de pretratamiento físico incluyen varios tipos de molienda/trituración (reducción de tamaño de partícula), irradiación, vapor/explosión de vapor, e hidrotermólisis, en la modalidad preferida, remojo, eliminación de los sólidos del líquido, explosión por vapor de los sólidos para crear la biomasa lignocelulósica pretratada.

La trituración incluye molienda de bola en seco,

en húmedo y vibratoria. Preferiblemente, el tratamiento previo físico implica el uso de alta presión y/o alta temperatura (explosión de vapor). En el contexto de la invención de alta presión se incluye presión en el rango de 3 a 6 MPa, preferiblemente 3.1 MPa. En el contexto de la invención, alta temperatura incluye temperaturas en el rango de aproximadamente 100 a 300°C, preferiblemente de aproximadamente 160 a 235°C. En una modalidad específica la impregnación se lleva a cabo a una presión de aproximadamente 3.1 MPa y a una temperatura de aproximadamente 235°C. En una modalidad preferida, el pretratamiento físico se lleva a cabo de acuerdo con el proceso descrito en el documento WO 2010/113129, cuyas enseñanzas totales se incorporan por referencia.

Aunque no sea necesario o preferido, las técnicas de pretratamiento químico incluyen ácido, ácido diluido, base, disolvente orgánico, cal, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono, hidrotermólisis de pH controlado, oxidación húmeda, y tratamiento con disolvente diluido.

Si el proceso de tratamiento químico es un proceso de tratamiento con ácido, que es más preferiblemente, una solución diluida continua o tratamiento ácido suave, tal como tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, o cualquier mezcla de los mismos. Otros ácidos también se pueden utilizar. El tratamiento con ácido suave significa al menos en el contexto de la invención que el pH de tratamiento está en el rango de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 3.

En una modalidad específica la concentración de ácido está en el rango de 0.1 a 2.0 % en peso de ácido, preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido se mezcla o contacta el material lignocelulósico y la mezcla se mantiene a una temperatura en el rango de alrededor de 160-220°C durante un periodo que va de minutos a segundos. En concreto las condiciones del pretratamiento pueden ser las siguientes: 165-183°C, 3-12 minutos, 0.5 a 1.4 % (p/p) de concentración de ácido, 15-25, preferiblemente alrededor de 20 % (p/p) en concentración total de sólidos. Otros métodos contemplados se describen en las patentes estadounidenses Nos. 4,880,473, 5,366,558, 5,188,673, 5,705,369 y 6,228,177.

Las técnicas de oxidación en húmedo implican el uso de agentes oxidantes, tales como agentes oxidantes basados en sulfito y similares. Ejemplos de tratamientos de disolventes incluyen el tratamiento con DMSO (dimetil sulfoxido) y similares. Los procesos de tratamiento químico se llevan a cabo durante aproximadamente 5 a aproximadamente 10 minutos, pero pueden llevarse a cabo durante periodos más cortos o más largos de tiempo.

Las técnicas de pretratamiento biológico incluyen la aplicación de microorganismos solubilizantes de lignina (véase, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, *Pre-treatment of biomass*, en *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212; Ghosh, P., y Singh, A., 1993, *Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of ligno-cellulosic biomass*, *Adv. Appl. Microbiol.* 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, *Pre-treating ligno-cellulosic biomass: a review*, in *Enzymatic*

Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds. , *ACS Symposium Series* 566, *American Chemical Society*, Washington, D.C., capítulo 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G., 1999, *Ethanol production from renewable resources*, en *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, 65: 207-241; Olsson, L., y Hahn-Hagerdal , B., 1996, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*, *Enz. Microb. Tech.* 18: 312-331; y Vallander, L., y Eriksson, K.-E. L., 1990, *Production of ethanol from ligno-cellulosic materials: State of the art*, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 42: 63-95).

En una modalidad, el pre-tratamiento tanto químico como físico se lleva a cabo incluyendo, por ejemplo, tanto el tratamiento ácido suave como el de alta temperatura y el tratamiento de la presión. El tratamiento químico y físico pueden llevarse a cabo de forma secuencial o simultáneamente.

En una modalidad preferida, el pre-tratamiento se lleva a cabo como un paso de remojo con agua mayor a 1°C, eliminando la biomasa lignocelulósica del agua, seguida de una etapa de explosión a vapor.

En una modalidad preferida, el material lignocelulósico pretratado se compone de azúcares complejos, también conocidos como glucanos y xilanos (celulosa y hemicelulosa) y lignina.

ENZIMA O MEZCLA DE ENZIMAS

30

Una enzima o mezcla de enzima significa una

enzima o mezcla de enzimas celulolíticas capaces de degradar la biomasa lignocelulósica. Una enzima o mezcla de enzima producida de acuerdo con el proceso descrito puede ser de cualquier origen, incluyendo de origen bacteriano o fúngico. Los variantes modificados químicamente o proteínas creadas están incluidos. La enzima o enzimas adecuadas incluyen enzimas o mezclas de enzimas en general de *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Thermobifida* y *Trichoderma*, por ejemplo, la enzima o mezclas de enzimas fúngicas producidas por *Humicola insolens*, *Thermobifida fusca*, *Cellulomonas fimi*, *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris*, *Fusarium oxysporum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium decumbens* y *Trichoderma reesei*.

En una modalidad la mezcla de enzima o enzima producida es un complejo de enzima o mezcla de enzimas homólogo a la célula huésped. En una modalidad la mezcla de enzima o enzima producida es un complejo de enzima o mezcla de enzimas homólogo a una célula huésped del género *Penicillium*, preferiblemente una cepa de *Penicillium decumbens*.

Es de entenderse que la enzima o mezcla de enzima producida también puede ser una enzima o mezcla de enzimas de monocomponente, por ejemplo, comprender una endoglucanasa, exo-celobiohidrolasa, Glu-cohidrolasa, o beta-glucosidasa producida de forma recombinante en una célula huésped adecuada. Las células huésped adecuadas se describen más adelante.

La enzima o mezcla de enzima producida también puede ser una preparación de mezcla de enzima o enzima

donde se eliminan o se inactivan uno o más componentes de la mezcla de la enzima o enzimas homólogas a partir de la célula huésped que produce de forma nativa la mezcla de enzima o enzima.

5

CÉLULA HUÉSPED CAPAZ DE PRODUCIR UNA ENZIMA O MEZCLA DE ENZIMAS

La célula huésped puede ser de cualquier origen. Como se mencionó anteriormente la mezcla de enzima o enzima puede ser homóloga o heteróloga a la célula huésped capaz de producir la mezcla de enzima o enzima.

El término "célula huésped recombinante", como se usa aquí, significa una célula huésped que alberga gen(es) que codifica la enzima o mezcla de enzimas y es capaz de expresar dicho gen(es) para producir la enzima o mezcla de enzimas, en donde el gen(es) de codificación de la mezcla de enzima o enzima se ha transformado, transfectado, transductado, o similar, en la célula huésped. La técnica de transformación, transfección o transducción utilizada puede ser bien conocida en la técnica. En una modalidad preferida, el gen se integra en el genoma de la célula huésped recombinante en una o más copias.

Cuando la mezcla de enzima o enzima es heteróloga, la célula huésped recombinante capaz de producir la mezcla de enzima o enzima es preferiblemente de origen fúngico o bacteriano. La elección de la célula huésped recombinante en gran medida depende de el gen(es) que codifica para la enzima o mezcla de enzimas y el origen de la mezcla de enzima o enzima.

El término "célula huésped de tipo salvaje", como

se usa aquí, se refiere a una célula huésped que alberga de forma nativa el gen(es) que codifica para la enzima o mezcla de enzimas y es capaz de expresar dicho gen(es). Cuando la mezcla de enzima o enzima es una preparación

5 homóloga o enzima o de la mezcla de complejo de enzimas de la célula huésped de tipo salvaje o mutante de la misma capaz de producir la enzima o mezcla de enzimas es preferiblemente de origen fúngico o bacteriano.

Un "mutante de la misma" puede ser una célula

10 huésped de tipo salvaje en la que se han eliminado uno o más genes o inactivados, por ejemplo, con el fin de enriquecer la enzima o preparación de la mezcla de enzimas en un determinado componente. Una célula huésped mutante también puede ser una célula huésped de tipo salvaje

15 transformada con uno o más genes que codifican enzimas o proteínas adicionales con el fin de introducir una o más actividades enzimáticas adicionales u otras actividades en la enzima o mezcla de enzimas o complejo o preparación nativamente producida por la célula huésped de tipo

20 salvaje. La enzima(s) adicional puede tener la misma actividad (por ejemplo, actividad de enzima o mezcla de enzimas) o ser simplemente ser otra molécula de la enzima, por ejemplo, con diferentes propiedades. La célula huésped de tipo salvaje mutante también puede tener genes de

25 codificación de enzimas homólogas adicionales transformadas, transfectadas, transducadas, o similares, preferentemente integradas en el genoma, con el fin de aumentar la expresión de ese gen para producir más enzima.

En una modalidad preferida, la célula huésped

30 recombinante o de tipo salvaje es de origen fúngico filamentoso. Ejemplos de células huésped incluyen los

seleccionados del grupo que comprende Acremonio, Aspergillus, Aureobasidium, Bjerkandera, Ceriporiopsis, Chrysosporium, Coprinus, Coriolus, Cryptococcus, Filobasidio, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromyces, Pleurotus, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trametes, o célula Trichoderma.

En una modalidad más preferida se selecciona la célula huésped filamentosa fúngica del grupo que comprende una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En una modalidad aún más preferida, la cepa es *Penicillium decumbens*.

En otra modalidad preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una cepa de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium Cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *sambucinum Fusarium*, *Fusarium sarcochroum*, *sporotrichioides Fusarium*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o célula *Fusarium venenatum*. En otra modalidad preferida, la célula huésped filamentosa fúngica se selecciona del grupo que comprende una cepa de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *pannocinta Ceriporiopsis*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, o *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Chrysosporium lucknowense*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus*

hirsutus, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor
miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa,
Penicillium purpurogenum, Penicillium decumbens,
Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus
5 eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes
versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii,
Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, o
Trichoderma viride.

En otra modalidad preferida, la célula huésped
10 recombinante o de tipo salvaje es de origen bacteriano.
Ejemplos de células huésped incluyen los seleccionados del
grupo que comprende bacterias gram positivas tales como una
cepa de Bacillus, por ejemplo, Bacillus alkalophilus,
Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus
15 circulans, Bacillus coagulans, Bacillus lautus, Bacillus
lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium,
Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, o Bacillus
thuringiensis; o una cepa de Streptomyces, por ejemplo,
Streptomyces lividans o Streptomyces murinus; o de una
20 bacteria gram negativa, por ejemplo, E. coli o Pseudomonas
sp.

USO

25 En otro aspecto, el proceso se refiere al uso de
material lignocelulósico pretratado como una fuente de
alimentación de átomos de carbono para la producción de una
enzima o mezcla de enzimas en una célula huésped.

El proceso también se refiere al uso de material
30 lignocelulósico pretratado como fuente de carbono en los
procesos de producción de enzima o mezcla de enzimas. El

proceso que se describe y reivindica en el presente documento no ha de limitarse en su alcance por las modalidades específicas aquí descritas, ya que estas modalidades están destinadas como ilustraciones de varios aspectos de la invención. Cualquier modalidad equivalente se pretende que esté dentro del alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Tales modificaciones también pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En caso de conflicto, la presente descripción, incluyendo las definiciones controlará.

El proceso también puede tener pasos adicionales en el que se utilizan las enzimas recolectadas en el proceso además para hidrolizar la primera biomasa lignocelulósica. Preferiblemente la primera biomasa lignocelulósica y la segunda biomasa lignocelulósica deben derivarse del mismo género de hierba y más preferiblemente derivados de las mismas especies de hierba. También es preferible que la primera de biomasa lignocelulósica en la que la hidrólisis enzimática será llevada a cabo sea tratada previamente antes de la hidrólisis enzimática.

También se ha descubierto que la enzima o mezcla de enzimas hecha por el proceso descrito, así como la biomasa lignocelulósica que ha sido hidrolizada por una enzima o mezcla de enzimas se ha producido de acuerdo con el proceso descrito. Por lo tanto, este proceso es aplicable para hacer crecer la célula huésped en la presencia de una primera biomasa lignocelulósica pretratada y luego se usa para tratar la segunda biomasa

lignocelulósica pretratada y que la primera y segunda biomasa lignocelulósicas pretratadas se pueden derivar a partir del grupo seleccionado de entre el mismo género de la planta y las mismas especies de plantas.

5 También se reivindica en esta invención la enzima producida de acuerdo con el proceso descrito y la biomasa lignocelulósica que ha sido hidrolizada por la enzima o los procesos descritos.

10

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El cultivo de la célula huésped para la producción de la enzima(s) procede en el siguiente ejemplo.

15 Cada cultivo de célula huésped, que en el primer ejemplo se utilizó *Penicillium decumbens* como la célula huésped, comenzó a partir de una solución de esporas recuperada de una placa de PDA sembrada con esporas frescas siete días antes de la recuperación.

20 1) el pre -cultivo que no es parte del proceso de cultivo reivindicado y

2) el cultivo de la célula huésped en donde la célula huésped se cultiva y la enzima(s) se produce.

PRECULTIVO

25

Plantación de Placa de PDA:

1. 500 µl de una solución de esporas previamente recolectada se vaciaron en una placa de PDA (3.9% de medio de Agar de Dextrosa de Papa) preparados como se conoce en la técnica.

30

2. 500 µl de solución estéril de 0.9% de NaCl se dispersaron sobre las esporas y el matraz se giró sutilmente hasta que la superficie estuvo toda cubierta por el líquido.
- 5 3. El matraz se cerró con un tapón de algodón cubierto con papel aluminio e incubado a 30°C durante 7 días.

Recuperación de la Solución de Esporas:

- 10 4. Después de 7 días, 10 ml de solución estéril de 0.9% de NaCl se vaciaron en el matraz.
5. El matraz fue girado sutilmente hasta que el líquido se hizo turbio.
- 15 6. Lo más posible de volumen de la solución de NaCl fue retirada al remover la solución de esporas a un tubo estéril.
7. La solución de esporas se puede almacenar definitivamente a 4°C.

20 **Paso de Fijación de Cultivo**

- Antes de empezar el cultivo de las células huésped, es necesario fijar el cultivo.
- 25 El medio de pre-cultivo se prepara como se reporta más adelante eligiendo el volumen para que sea de al menos una décima parte de la fase de cultivo:

30

Composición del medio de precultivo % p/v		g	G
Peptona	1.00%	1.00	10.00
Biomasa de lignocelulosa pretratada	2.00%	2.00	20.00
KH2O4	0.30%	0.30	3.00
MgSO4	0.05%	0.05	0.50
(NH4)2SO4	0.20%	0.20	2.00
CaCO3	0.50%	0.50	5.00
Agua a añadir (ml)		65	650
Glucosa		2.00*	20.00*
Volumen Final		100	1000

5 1. La solución de glucosa y esporas se añaden
después de la esterilización. El volumen de la solución
de esporas se elige para obtener una concentración final
de 5000 CFU/ml.

 2. Este precultivo se incubaba a 30°C, 170 rpm
10 durante 30 h.

Cultivo de Célula Huésped y Producción de Enzimas:

 El entorno del cultivo de la célula huésped se
15 prepara como se reporta en la siguiente tabla.

Composición de Medio de Cultivo de Célula Huésped	% p/v
Material de biomasa lignocelulósica pretratada (en una base seca)	4.50%
Urea	0.50%
Tween	0.10%
Glucosa (preferentemente 0.0)	0.4%
	v/v
Volumen del medio de precultivo del paso anterior	10.1%

20 1. Después de la esterilización, el pH se
corrigió a 5.3 y el azúcar simple opcional (glucosa) y el
volumen de precultivo se añadieron. El pH se controla en
matraces usando diferentes tipos de soluciones tampón
25 (por ejemplo, tampón de 0.1 M de fosfato).

 2. El cultivo de la célula huésped y la
producción de enzimas se llevaron a cabo a 30°C fijando
170 rpm para los matraces y 500 rpm para los
fermentadores. El suministro de aire en los fermentadores
30 se modificó durante el cultivo de células con base en los
requerimientos de los microorganismos.

RESULTADOS

Las tablas siguientes comparan la actividad de la biomasa lignocelulósica pretratada utilizada para alimentar a la célula huésped. El ejemplo comparativo (CE1) es la extracción de la mezcla de enzimas realizada a través de métodos tradicionales, donde la alimentación de la célula huésped es principalmente, si no toda, de glucosa. El ejemplo de trabajo (WE1) fue producido como se ha descrito anteriormente en donde la gran mayoría de los azúcares consumidos por la célula huésped que se deriva de la biomasa lignocelulósica pretratada. Es claro a partir de los datos que, cuando la célula huésped se cultiva en presencia de la biomasa lignocelulósica, las enzimas producidas son mucho más activas a la biomasa lignocelulósica que las enzimas producidas a partir de la misma cepa de células huésped alimentadas sólo con la glucosa.

TABLA 1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DESPUÉS DE 138 h

	Celulásica total	β-glucosidasa	Xylanasa
	Contenido de actividad después de 138h U/ml		
WE1	0.68	3.31	23.86
CE1	0.00	0.34	5.72
	Rendimiento relativo, %		
WE1	100%	100%	100%
CE1	0%	18%	8%

Es aparente de la Tabla 1, que las enzimas derivadas de la célula huésped alimentadas a la biomasa lignocelulósica son 5 veces más activas que las derivadas del ejemplo comparativo.

La Tabla 2 muestra el desarrollo de la actividad con el tiempo del ejemplo comparativo. Como es fácilmente aparente, en ningún momento la actividad del ejemplo comparativo excede la actividad del ejemplo de trabajo.

TABLA 2: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN COMPARACIÓN CON EL TIEMPO

	Tiempo, hrs					
	0	65.7	89.7	113.7	137.7	161.7
	Actividad celulásica total, U/ml					
WE1	0	0.333685	0.547819	0.733553	0.681827	0.515875
CE1	0	0.013113	0.014792	0	0	0
	Actividad de Beta-glucosidasa, U/ml					
WE1	0	0.528679	0.667978	2.354583	3.307823	2.851688
CE1	0	0.469901	0.579264	0.46	0.341527	0.501366
	Actividad de Xilanasa, U/ml					
WE1	0	20.79375	15.4646	23.85919	16.96183	13.13234
CE1	0	1.607751	3.45798	5.722076	1.339955	2.678937

Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados del proceso según se aplicó a las varias biomاسas lignocelulósicas (mazorca de maíz, *arundo*, *populus*, cáscara de trigo, *miscanthus* y bagazo) así como *arundo* con las otras dos células huésped listadas. Esto establece el método para varios tipos de células huésped y biomاسas lignocelulósicas.

TABLA 3. DEMOSTRACIÓN DE *P. DECUMBENS* EN DIFERENTES TIPOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Tiempo, hrs					
0	66	90	114	138	
Actividad de FPasa, U/ml					
Arundo	0.00	0.49	0.64	0.62	0.83
Mazorca de maíz	0.00	0.34	0.54	0.53	0.51
Populus	0.00	0.31	0.40	0.44	0.52
Cáscara de trigo	0.00	0.26	0.53	0.47	0.63
Miscanthus	0.00	0.47	0.65	0.78	0.97
Bagazo	0.00	0.37	0.55	0.54	0.81

TABLA 4. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE DIFERENTES MICROORGANISMOS EN ARUNDO

Actividad de FPasa, U/ml						
	Tiempo, h					
	0	66	90	114	138	168
Penicillium decumbens	0.00	0.49	0.64	0.62	0.83	
Trichoderma reesei RUTC30	0.00	0.62	1.55	1.78	1.90	2.19
Phanerochaete chrysosporium	0.00	0.00	0.001	0.00215	0.006	0.31
Trichoderma reesei QM9414	0.00	0.05	0.41	0.63	0.75	0.85

FPasa es la actividad de enzimas probada en papel filtro y después combinada con la actividad de exo-
endocelulasas y beta-glucosidasa, el ensayo de Ghose.

Para demostrar el efecto de la glucosa añadida, se agregó glucosa al entorno de cultivo en la cantidad indicada en la Tabla 5 y la Tabla 6. La cantidad añadida es el porcentaje por peso del entorno de cultivo total. Como puede verse en la tabla, la cantidad de actividad enzimática se reduce a medida que la cantidad de glucosa

aumenta. La proporción es la proporción de la cantidad de glucosa opcional añadida a la cantidad de azúcares del material lignocelulósica pretratado.

5

TABLA 5

10

15

Azúcar simple opcional (Glucosa) añadida (porcentaje en peso seco de entorno de cultivo)	Proporción de Azúcares Simples a azúcares en la biomasa	Tiempo de cultivo, hrs				
		0	66	90	114	138
		Actividad de FPasa, U/ml				
0.0%	0.00	0.000	0.441	0.532	0.576	0.688
0.4%	0.33	0.000	0.306	0.469	0.547	0.653
0.7%	0.53	0.000	0.245	0.382	0.538	0.610
1.4%	1.12	0.000	0.170	0.314	0.557	0.587
2.0%	1.63	0.000	0.091	0.223	0.407	0.472

20

TABLA 6

25

30

Azúcar simple opcional (Glucosa) añadida (porcentaje en peso seco de entorno de cultivo)	Proporción de Azúcares Simples a azúcares en la biomasa	Tiempo de cultivo, hrs				
		0	66	90	114	138
		Actividad de Xilanasa, U/ml				
0.0%	0.00	0.000	21.68	17.22	15.41	12.83
0.4%	0.33	0.000	18.51	16.88	14.67	10.70
0.7%	0.53	0.000	16.21	17.83	18.94	13.65
1.4%	1.12	0.000	14.85	19.40	29.54	11.11
2.0%	1.63	0.000	10.14	12.44	13.37	12.25

La actividad de FPasa (papel filtro) y xilanasa se determinaron usando los métodos conocidos en la industria para la determinación de la actividad enzimática. La diferencia es que el papel filtro fue el sustrato para FPasa y la mezcla de xilano descrita más adelante fue usada como el sustrato de xilano.

10

15

Código	Sustrato	Tipo de Actividad	Preparación
Actividades Principales			
FIP	Papel Filtro	Actividad de degradación de celulosa	Tira de papel Filtro de 15 mg Whatman No. 1 (0.55 x 3.29 cm)
Xyl	Xilano	Xilanasa	Xilano Birchwood de 2 g (Sigma X0502) 70 ml de agua ultrapura Calentar hasta que hierva con agitación. Enfriar a temperatura ambiente y añadir 5 ml de solución concentrada de tampón a 1 N

20

REIVINDICACIONES

1. Un proceso que produce al menos una enzima a partir de una célula huésped para la hidrólisis de una primera biomasa lignocelulósica pretratada en donde dicho proceso comprende el paso de cultivar la célula huésped que es capaz de producir la al menos una enzima durante un tiempo de cultivo, en donde el cultivo de la célula huésped sucede en un entorno de cultivo que comprende,

la célula huésped que es *Penicillium decumbens*, la segunda biomasa lignocelulósica pretratada que comprende azúcares complejos;

el cultivo se hace bajo condiciones de ayuno de azúcar simple teniendo una cantidad de azúcar o azúcares simples añadidos opcionalmente en el rango de 1 a 10% en peso del entorno de cultivo en una base seca durante una porción del tiempo de cultivo que es al menos el 50% del tiempo de cultivo;

el entorno de cultivo es nulo de vitaminas, minerales, sales minerales, lactosa e isopropil β-D.1.tiogalactopiranosida; y

el contenido de materia seca por peso de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada en el entorno de cultivo es mayor al 4%.

25

2. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado porque el contenido de materia seca por peso de la segunda biomasa lignocelulósica pretratada en el entorno de cultivo es mayor a un valor seleccionado del grupo que consiste de 6%, 8%, 10%, 15%.

30

3. El proceso de cualquiera de las

reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la porción del tiempo de cultivo bajo condiciones de ayuno de azúcar simple es de al menos el 75% del tiempo de cultivo.

5 4. El proceso de la reivindicación 3, caracterizado porque la porción del tiempo de cultivo bajo condiciones de ayuno de azúcar simple es de al menos el 85% del tiempo de cultivo.

10 5. El proceso de la reivindicación 4, caracterizado porque la porción del tiempo de cultivo bajo condiciones de ayuno de azúcar simple es de al menos el 90% del tiempo de cultivo.

15 6. El proceso de la reivindicación 5, caracterizado porque la porción del tiempo de cultivo bajo condiciones de ayuno de azúcar simple es de al menos el 95% del tiempo de cultivo.

20 7. El proceso de la reivindicación 6, caracterizado porque la porción del tiempo de cultivo bajo condiciones de ayuno de azúcar simple es de al menos el 98% del tiempo de cultivo.

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la porción del tiempo de cultivo bajo condiciones de ayuno de azúcar simple es el mismo que el tiempo de cultivo.

25 9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cantidad de azúcar o azúcares simples opcionalmente añadidos está en el rango de 0 a 5% por peso del entorno de cultivo en una base seca.

30 10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cantidad

de azúcar o azúcares simples opcionalmente añadidos está en el rango de 0 a 2.5% por peso del entorno de cultivo en una base seca.

5 11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cantidad de azúcar o azúcares simples opcionalmente añadidos está en el rango de 0 a 2.0% por peso del entorno de cultivo en una base seca.

10 12. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la cantidad de azúcar o azúcares simples opcionalmente añadidos está en el rango de 0 a 1.0% por peso del entorno de cultivo en una base seca.

15 13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque no hay azúcar o azúcares simples opcionales añadidos en el entorno de cultivo.

20 14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la enzima es recolectada al remover la enzima del entorno de cultivo.

25 15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la enzima se usa además para hidrolizar la primera biomasa lignocelulósica y la primera biomasa lignocelulósica y la segunda biomasa lignocelulósica pretratada, ambas comprendiendo biomasa lignocelulósica derivada del mismo género de hierba.

30 16. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la enzima se usa además para hidrolizar la primera biomasa

lignocelulósica y la primera biomasa lignocelulósica y la segunda biomasa lignocelulósica pretratada, ambas comprendiendo biomasa lignocelulósica derivada de la misma especie de hierba.

- 5 17. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, caracterizado porque la primera biomasa lignocelulósica es pretratada antes de la hidrólisis enzimática.

RESUMEN

Este descripción divulga un proceso para la
producción de al menos una enzima a partir de una célula
5 huésped para la hidrólisis de una primera biomasa
lignocelulósica pretratada bajo condiciones de ayuno de
azúcar simple, en donde el entorno de cultivo tiene muy
pocos, o de preferencia nada, azúcares simples añadidos
diferentes a los presentes en una biomasa lignocelulósica
10 usada para alimentar y hacer crecer la célula huésped. El
entorno de cultivo está sustancialmente nulo de
estimuladores de fermentación e inductores de producción
de enzimas. Preferentemente, el entorno de cultivo tiene
un contenido alto de materia seca de la biomasa
15 lignocelulósica pretratada.

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2013/053924 A1

(43) International Publication Date
18 April 2013 (18.04.2013)

(51) International Patent Classification:
C12N 1/14 (2006.01) C12N 9/42 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2012/070340

(22) International Filing Date:
12 October 2012 (12.10.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
IT02011A000918 13 October 2011 (13.10.2011) IT

(71) Applicant: **C5-6 ITALY S.R.L.** [IT/IT]; Strada Savonesa 9, Frazione Rivalta Scrivia, I-15057 Tortona (Alessandria) (IT).

(72) Inventors: **VOLPATI, Laura**; Via Tagiura 23, I-20146 Milano (IT). **RIVAS TORRES, Beatriz**; Via Terrarossa 37, I-16011 Arenzano (Genova) (IT). **PARAVISI, Stefano**; Via dei Ronchi 78, I-24059 Ugnano (Bergamo) (IT).

(74) Agents: **GERBINO, Angelo** et al.; c/o Jacobacci & Partners S.p.A., Corso Emilia 8, I-10152 Torino (IT).

(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, BN, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CL, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

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

WO 2013/053924 A1

(54) Title: SIMPLE SUGAR STARVED LIGNOCELLULOSIC BIOMASS ENZYME PRODUCTION

(57) Abstract: This specification discloses a process for producing at least one enzyme from a host cell for the hydrolysis of a first pre-treated ligno-cellulosic biomass under simple sugar starved conditions wherein the cultivation environment has very little, preferable no, simple sugars added other than those present in a ligno-cellulosic biomass used to feed and grow the host cell. The cultivation environment is substantially void of fermentation stimulators and inducers of enzyme production. Preferably, the cultivation environment has a high dry matter content of the pre-treated ligno-cellulosic biomass.

SIMPLE SUGAR STARVED LIGNOCELLULOSIC BIOMASS ENZYME PRODUCTION

BACKGROUND

5

It is known that the hydrolysis of cellulose and hemicellulose from ligno-cellulosic feedstocks requires a well-balanced mixture of enzymes consisting of endoglucanases, cellobiohydrolases, β -glucosidases, xylanases, mannanases and various enzymes acting on side chains of xylans and mannans. Enzyme production is an important step in the biomass-to-ethanol process as enzyme or enzyme mixture production and application are currently among the more costly processing steps for biologically based routes to ligno-cellulose material utilization.

15

The enzyme systems of the plant degrading fungus *Trichoderma reesei* are the most extensively investigated and believed to be the most widely organism used to obtain commercial enzyme mixtures. *T. reesei* produces numerous cellulose- and hemicellulose-degrading enzymes even if extracellular β -glucosidase secretion is low. As it is well known that β -glucosidase activity content is critical in order to obtain high cellulose conversion, *T. reesei* enzyme solution is commonly supplemented with β -glucosidases to obtain a well-balanced enzyme solution and further advance the hydrolysis of the cellulose. In other cases commercial enzyme or enzyme mixture solutions could also be obtained using enzymes produced by other, good β -glucosidase-producing fungi.

25

30

Even if no clear relationship between the substrate used for cultivation and the hydrolytic performance of the resulting enzymes on the particular substrates has been reported in

52

previous studies on *T. reesei* Rut C30 (See Juhasz, T., Sze-
gyel, Z., Reczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. (2 Charac-
terization of enzyme or enzyme mixtures and hemienzyme or en-
zyme mixtures produced by *Trichoderma reesei* on various car-
bon sources. Process Biochem, 40, 3519-3525) or *Penicillium*
5 *brasillianum*, (See Jorgensen, H., Olsson, L. (2 Production of
enzyme or enzyme mixtures by *Penicillium brasillianum* IBT
20888: Effect of substrate on hydrolytic performance. Enzyme
Microb Technol, 38, 381-390) many research groups had tried
10 to produce enzyme or enzyme mixtures using in some manner the
same material used for bio-ethanol production to reduce final
enzyme mixture costs.

One such process is described in WO 2007005918. This process
15 adds the described pre-treated ligno-cellulosic substrate as
an inducer of enzyme growth, while using constant addition of
glucose as the feed for the organism growth. The stated pur-
pose of this technology is to replace pure cellulose used to-
day for enzyme or enzyme mixture production in a host cell,
20 with pre-treated ligno-cellulosic material, such as, espe-
cially pre-treated Arundo Donax (PCS) as described in WO
2007005918. The advantage of this is that the production cost
is reduced due to use of an inducer (ligno-cellulosic bio-
mass) which is easily available and thus cheaper than pure
25 cellulose. As an inducer, WO 2007005918 uses a small amount
of biomass and continually adds glucose to feed the organism.

Even by using ligno-cellulosic biomass as an inducer, the
cost of enzymes remains high and it is key factor limiting
30 the diffusion of the enzymatic technologies. The main factors
limiting the cost decrease of enzymes are represented by the
cost of the ingredients used for promoting the growth of the
micro-organism and operating costs. Among the ingredients,

main costs are represented by the glucose, fermentation stimulators such as vitamins and mineral salts, and inducers of enzyme production, such as lactose and Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Fermentation stimulators and
5 inducers of enzyme production are expensive even if used in small amount. On the side of operating costs, the energy needed for agitating the fermentation medium and the total fermentation time are to be considered.

10 There is therefore the need of an inexpensive process for producing an enzyme or enzyme mixture.

SUMMARY

15 Disclosed in this specification is a process for producing at least one enzyme from a host cell for the hydrolysis of a first pre-treated ligno-cellulosic biomass wherein said process comprises the steps of cultivating the host cell which is capable of producing the at least one enzyme for a cultivation
20 tion time, wherein the cultivation of the host cell occurs in a cultivation environment comprising the host cell, a second pre-treated ligno-cellulosic biomass, said second pre-treated ligno-cellulosic biomass comprised of complex sugars, and optionally simple sugars; the cultivation is done under simple
25 sugar starved conditions of having an optional added simple sugar in the range of 0 to 10% by weight of the cultivation environment on a dry basis for at least a portion of the cultivation time; and the cultivation environment is substantially void of added vitamins, and/or added minerals and/or
30 added inducers of enzymes production.

It is also disclosed that the dry matter content by weight of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass in the culti-

vation environment may be higher than 2%, preferably higher than 4%, more preferably higher than 6%, even more preferably higher than 8%, yet even more preferably higher than 10%, most preferably higher than 15%.

5

It is further disclosed that the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions may be selected from the group consisting of at least 50% of the cultivation time, at least 75% of the cultivation time, at least 85% of the cultivation time, at least 90% of the cultivation time, at least 98% of the cultivation time, and a period equal to the cultivation time.

It is further disclosed that the optional added simple sugar may be in a range selected from the group consisting of 0 to 5% by weight of the cultivation environment on a dry basis, 0 to 2.5% by weight of the cultivation environment on a dry basis, 0 to 2.0% by weight of the cultivation environment on a dry basis, 0 to 1.0% by weight of the cultivation environment on a dry basis and no optional simple sugar.

It is further disclosed that the enzyme or enzyme mixture may be harvested by removing the enzyme or enzyme mixture from the cultivation environment and that it may be further used to hydrolyze the first ligno-cellulosic biomass and the first ligno-cellulosic biomass and the second pretreated ligno-cellulosic biomass both comprise ligno-cellulosic biomass derived from group consisting of the same grass genus or more preferably the same grass species.

30

It is also disclosed that there is an enzyme produced, a hydrolyzed ligno-cellulosic biomass by the enzyme or enzyme mixture produced under the simple sugar starved conditions.

Detailed Description

It has been discovered a process for producing an enzyme or enzyme mixture from a host cell by cultivating the host cell on a minimal cultivation environment, thereby proving a method for producing enzymes at a low cost.

According to one aspect of the invention, it has been discovered that the activity on a pre-treated ligno-cellulosic biomass material of an enzyme or enzyme mixture produced from a host cell can be enhanced when the simple sugars such as glucose and xylose used to traditionally feed host cells are replaced with the pre-treated ligno-cellulosic material, such as, pre-treated Arundo Donax. The pre-treated ligno-cellulosic material is preferably pre-treated by soaking and washing in hot water and pressing to remove the water and water soluble compounds. The soaking pre-treatment removes the soluble sugar monomers (xylose and glucose). Besides of enhancing the activity of the enzyme produced, the pre-treated ligno-cellulosic material is significantly less expensive than glucose and xylose sources used for traditionally feeding the host cells. Moreover, a significant reduction of time is obtained, when the pre-treated ligno-cellulosic material is used as the unique carbon source, and no or few added simple sugars are added to the cultivation environment.

According to another aspect of the invention, it has been discovered that the cultivation of the host cell producing the enzyme or enzyme mixture does not require the addition of expensive fermentation stimulators, such as vitamins and minerals or mineral salts, and/or added enzyme producing inducers, such as lactose and ITPG, thereby the cultivation environment comprising the pre-treated ligno-cellulosic material

is void, or substantially void, of added fermentation stimulators and added inducers of enzyme production. In the present disclosure, by the expression "substantially void of added fermentation stimulators" it is meant that the concentration in the cultivation environment of each added fermentation stimulator (both vitamin and minerals) is less than 1g/l, more preferably less than 500mg/l, even more preferably less than 200mg/l, yet even more preferably less than 100mg/l, yet even more preferably less than 50mg/l, yet even more preferably less than 10mg/l, yet even more preferably less than 5mg/l, most preferably less than 2mg/l. These concentration values are significant less than the concentration values usually used in similar processes known in the art. In the present disclosure, by the expression "substantially void of added inducers of enzyme production" it is meant that the concentration in the cultivation environment of each added inducers of enzyme production (both lactose and ITPG) is less than 100mg/l, more preferably less than 50mg/l, even more preferably less than 20mg/l, yet even more preferably less than 10mg/l, most preferably less than 5mg/l. These concentration values are significant less than the concentration values usually used in similar processes known in the art.

According to a further aspect of the invention, it has been discovered that the cultivation of the host cell producing the enzyme or enzyme mixture may occur in a cultivation environment having a dry matter content by weight of the pre-treated ligno-cellulosic material substantially higher than previously disclosed method. The dry matter content by weight of the pre-treated ligno-cellulosic material in the cultivation environment may higher than 2%, preferably higher than 4%, more preferably higher than 6%, even more preferably higher than 8%, yet even more preferably higher than 10%,

most preferably higher than 15%. The increase in the dry matter content reduces the energy per gram of the cultivation environment required for agitating the cultivation environment, with respect to previously disclosed processes. Moreover, the amount of cultivation environment needed for producing a certain amount of enzymes is reduced, and correspondingly the volume of the equipment (bio-reactor), thereby generating a further reduction in investment costs.

10 A further advantage of the invention is that the enzyme mixture coming from the host cell is more reactive to the pre-treated ligno-cellulosic material used to feed and grow the host cell when the enzyme mixture is used to hydrolyze similar pre-treated ligno-cellulosic materials.

15 A person skilled in the art will appreciate that the features of the disclosed process significantly reduce the production cost of enzymes.

20 Process of Producing Enzymes

It is well known in the art to produce enzyme or enzyme mixture in a host cell of fungal origin, such as filamentous fungi, or bacteria origin. The growth process of the invention may be a well known process, except that the feed, such as pure glucose, is limited and the primary feed be pre-treated ligno-cellulosic material.

Enzyme production procedures are well known in the art. In context of the present invention the enzyme or enzyme mixture is preferably an extra-cellular enzyme or enzyme mixture secreted into the fermentation medium by the host cell. Alternatively, the enzyme or enzyme mixture is intracellular.

A host cell capable of producing enzyme or enzyme mixture is grown under precise cultural conditions at a particular growth rate. When the host cell culture is introduced into the fermentation medium the inoculated culture passes through a number of stages. Initially growth does not occur. This period is referred to as the lag phase and may be considered a period of adaptation. During the next phase referred to as the "exponential phase" the growth rate of the host cell culture gradually increases. After a period of maximum growth the rate ceases and the culture enters stationary phase. After a further period of time the culture enters the death phase and the number of viable cells declines. When, in the growth phase the enzyme, or enzyme mixture of interest is expressed depends on the enzyme of interest and the host cell. The enzyme or enzyme mixture may, in one embodiment, be expressed in the exponential phase. In another embodiment, the enzyme or enzyme mixture may be produced in the transient phase between the exponential phase and the stationary phase. The enzyme or enzyme mixture may also, in another embodiment, be expressed in the stationary phase and/or just before sporulation. The enzyme or enzyme mixture may, according to the invention, also be produced in more than one of the above mentioned phases.

25

In other words, according to the invention the host cell is cultivated in a suitable medium and under conditions allowing at least one enzyme or an enzyme mixture to be expressed, preferably secreted and optionally recovered. While as noted above, the host cell growth has many technical phases, for the purposes of this specification, these phases are grouped together in the term cultivation. Host cell cultivation takes place in a fermentation medium comprising a carbon

30

source and a pre-treated ligno-cellulosic material as feed. According to a preferred embodiment the pre-treated ligno-cellulosic material has been pre-treated by being soaked/washed and then steam exploded as described in WO 2010113129, the teachings of which are incorporated by reference.

After fermentation the enzyme or enzyme mixture may optionally be recovered using methods well known in the art. For example, extra-cellular enzyme or enzyme mixture recovery from the fermentation medium may be done using conventional procedures including, but not limited to, centrifugation, filtration, extraction, spray-drying, evaporation, or precipitation. Procedures for recovery of an intracellular enzyme or enzyme mixture are also well known in the art.

At least in context of the present invention the interchangeable terms "cultivation" and "fermentation" means any process of producing an enzyme or enzyme mixture using a mass culture consisting of one or more host cells. The present invention is useful for especially industrial scale production, e.g., having a culture medium of at least 50 litres, preferably at least 1 litres, more preferably at least 5 litres.

The enzyme or enzyme mixture may include, but is not limited to any of those belonging to the group of enzyme or enzyme mixture comprising endoglucanases (endo-1, 4- β -D-glucanase), cellobiohydrolases or exoglucanases (exo-1, 4- β -D-glucanase), β -glucosidase (1, 4- β -D-glucosidase), endo-1,4- β -xylanase, endo-1,4- β -mannanase, 1,4- β -xylosidase, 1,4- β -mannosidase.

A process of the invention may be performed as a batch, a fed-batch, a repeated fed-batch or a continuous process.

A process of the invention may be carried out aerobically or anaerobically. Some enzymes are produced by submerged cultivation and some by surface cultivation. Submerged cultivation
5 is preferred according to the invention.

Thus, according to one aspect, the invention relates to processes of producing an enzyme or enzyme mixture in a host cell comprising cultivating said host cell capable of produc-
10 ing enzyme or enzyme mixture under conditions conducive for production of an enzyme or enzyme mixture, such as enzyme or enzyme mixture, wherein pre-treated ligno-cellulosic material is used to grow the host cell under simple sugar starved conditions.

15 More specifically, the described process produces at least one enzyme from a host cell for the hydrolysis of a first pre-treated ligno-cellulosic biomass wherein said process comprises the steps of first cultivating the host cell which
20 is capable of producing the at least one enzyme for a cultivation time, wherein the cultivation of the host cell occurs in a cultivation environment comprising the host cell, a second pre-treated ligno-cellulosic biomass, said second pre-treated ligno-cellulosic biomass comprised of complex sugars,
25 and optionally simple sugars; and the cultivation is done for at least a portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions wherein the cultivation environment may further comprise an optional added simple sugar in the range of 0 to 10% by weight of the cultivation environment on a dry
30 basis.

The cultivation time is the amount of time measured from the addition of the pre-culture volume to host cell cultivation

61

environment to the harvest, removal, or separation of the enzyme or enzyme mixture from the cultivation environment. In the case of multiple removals, the cultivation time ends at the time when the first enzyme or enzyme mixture is harvested
5 from the culture medium.

Complex sugars are those sugars which are not monomeric sugars. Simple sugars are the monomeric sugars, and may selected from the group consisting of glucose, xylose, arabinose, mannose, galactose, and fructose. It should be noted
10 that there may be other simple sugars not in the preceding list.

The amount of ligno-cellulosic biomass present in the cultivation environment should be sufficient for the growth of the
15 host cell to produce the amount of the enzyme or enzyme mixture desired.

The phrase simple sugar starved conditions means generally
20 that more than 50% by weight of the host cell feed is from the pre-treated ligno-cellulosic biomass and not from added simple sugars. An exemplary simple sugar starved condition is when the amount of optional simple sugars added to the process, if any is added at all, is in the range of 0 to 10%
25 by weight of the cultivation environment on a dry basis. More preferably, the optional simple sugars added should be in the range of 0 to 5% by weight of the cultivation environment on a dry basis, with 0 to 2.5 % by weight being even more preferred, with 0 to 2.0% being the most preferred (if
30 simple sugars are added at all). In the best case, there are no simple sugars added which is the perfect simple sugar starved condition. Additionally, the phrase simple sugars added means that there could be one or more simple sugars

added.

The presence of the optional simple sugars added can also be expressed as the ratio of the amount of the optional simple
5 sugars added to the amount of sugars from the pre-treated ligno-cellulosic biomass. The most preferred ratio is 0.0, which is the absence of any optional simple sugars. However, the ratio should be preferably less than 2.0 or 1.5, with less than 1.12 being more preferred, less than 0.53 being
10 even more preferred and less than 0.33 also being a preferred value. In one embodiment the optional simple sugar is present, but at less than the percentage indicated or present less than the ratio indicated.

15 The simple sugar starved conditions should be maintained for at least a portion of the cultivation time. Expressed quantitatively, the simple sugar starved conditions should be maintained for at least 50% of the cultivation time, with 75% being more preferred, 85% being even more preferred, with 95%
20 being even yet more preferred with 99 and 100% of the cultivation time being the most preferred. 100% of the cultivation time is when the at least a portion of the cultivation time equals the cultivation time.

25 In this manner, the growth of the host cell and its enzymes are influenced by the pre-treated ligno-cellulosic biomass feed of the second ligno-cellulosic biomass and adapt themselves over time to better hydrolyze the pre-treated ligno-cellulosic biomass. In this manner, when the enzyme mixture
30 is used to hydrolyze a ligno-cellulosic biomass, especially a pre-treated ligno-cellulosic biomass having a similar composition as the second pre-treated ligno-cellulosic biomass feed, there is more reactivity (i.e. better enzymatic hydro-

63
lysis) to the pre-treated ligno-cellulosic biomass.

Substrate and additives

5 The substrate used in a process of the invention may be any substrate known in the art. Suitable substrates are available from commercial suppliers or may be prepared according to published compositions (e.g., in catalogues of the American Type Culture Collection).

10

Carbon source substrates commonly used as feed for enzyme or enzyme mixture production includes glucose or similar sugars, provided their consumption relative to the consumption of the complex sugars is within the specified boundaries. Nitrogen
15 source substrates such as ammonia (NH_4Cl) or urea, may be added to improve cultivation and enzyme or enzyme mixture production. A key feature of the disclosed process is that no fermentation stimulators, with the exception of those already comprised in the pre-treated ligno-cellulosic material, are
20 added to the cultivation environment, or are added in a small amount, that is the cultivation environment does not comprise added fermentation stimulators or comprises added fermentation stimulators in smaller amount with respect to previously known processes. In the context of the present disclosure,
25 added fermentation stimulators for growth include vitamins and minerals. Vitamins which are not added or added in small amount are selected from the group consisting of: biotin, pantothenate, nicotinic acid, meso-inositol, thiamine, pyridoxine, para-aminobenzoic acid, folic acid, riboflavin, and
30 Vitamins A, B, C, D, and E. Minerals which are not added or added in a small amount are minerals and mineral salts that supply nutrients selected from the group consisting of: B, P, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, Co, Mo and Cu.

A key feature of the disclosed process is that no inducers of enzyme production, with the exception of those already comprised in the pre-treated ligno-cellulosic material, are added to the cultivation environment, or are added in a small amount, that is the cultivation environment does not comprise added inducers of enzyme production or comprises added inducers of enzyme production in smaller amount with respect to previously known processes. In the context of the present disclosure, inducers of enzyme production which are not added or added in a small amount to the cultivation environment are selected from the group consisting of lactose and ITPG.

Pure cellulose, usually used as an inducer (and carbon source) in enzyme or enzyme mixture production processes, is replaced with pre-treated ligno-cellulosic material, preferably detoxified if acid pre-treated, such as washed, pre-treated ligno-cellulosic material.

The pre-treated ligno-cellulosic material is a carbon source and may be added to the culture medium together with a carbon source, but may also be added separate from the carbon source. According to the invention the pre-treated ligno-cellulosic material may be added to the culture medium either prior to inoculation, simultaneously with inoculation or after inoculation of the host cell culture in an amount at least corresponding to the amount of available complex sugars needed to grow the host cell. When ligno-cellulosic biomass is added during the cultivation time, a new calculation of the amount optional simple sugars added or the ratio of optional simple sugars to ligno-cellulosic biomass is done. While the amount of simple sugars may not have been low enough during the initial part of the cultivation time, by adding ligno-cellulosic biomass to the cultivation environ-

ment, the amount of optional simple sugars added would fall within the specified ranges, at least for the time remaining in the cultivation time.

5 A person skilled in the art can easily determine when to add and what amount of pre-treated ligno-cellulosic material to add during a enzyme or enzyme mixture producing process of the invention. During the time span of cultivation pre-treated ligno-cellulosic material is preferably added in
10 amounts corresponding to the activity of glucose normally consumed by the cell host and kept within the previously specified limits.

As mentioned above pre-treated ligno-cellulosic material is
15 used the same way glucose is normally used in well known enzyme or enzyme mixture production processes.

For instance, when producing enzyme or enzyme mixture using a strain of Penicillium, such as Penicillium decumbens, as the
20 host cell, the glucans and xylans as present in the pre-treated ligno-cellulosic material were charged at a level of 2.7 total grams/L. A process of the invention may last for the same period of time as a corresponding traditional process, such as between 3 and 10 days. Penicillium fermentations, including Penicillium decumbens fermentations, in general
25 last for between 3-9 days.

Ligno-cellulosic Material

30 According to the invention "ligno-cellulosic material" includes any material that comprises ligno-cellulose. Ligno-cellulose is generally found, for example, in the stems, leaves, hulls, husks, and cobs of plants or leaves, branches,

and wood of trees. The ligno-cellulosic material can also be, but is not limited to, herbaceous material, agricultural residues, forestry residues, municipal solid wastes, waste paper, and pulp and paper mill residues. It is understood herein that ligno-cellulosic material may be in the form of plant cell wall material containing lignin, cellulose, and hemicellulose in a mixed matrix.

In an embodiment the ligno-cellulosic material is corn fiber, rice straw, pine wood, wood chips, poplar, wheat straw, switch grass, bagasse, Arundo donax, miscanthus, eucalyptus, bamboo, paper and pulp processing waste. In a preferred embodiment the ligno-cellulosic material is Arundo Donax. In another preferred embodiment the ligno-cellulosic material is woody or herbaceous plants selected from the group consisting of the grasses. Alternatively phrased, the preferred ligno-cellulosic biomass is selected from the group consisting of the plants belonging to the Poaceae or Gramineae family. The role of starch may be present but in naturally occurring amounts. The ligno-cellulosic biomass preferably has less than 70% by dry weight, with less than 50% starch by dry weight being more preferred and less than 25% by dry weight being most preferred.

25 Pre-treatment

According to the invention ligno-cellulosic material is pre-treated. The term "pre-treated" may be replaced with the term "treated". However, preferred techniques contemplated are those well known for "pre-treatment" of ligno-cellulosic material as will be describe further below.

As mentioned above treatment or pre-treatment may be carried

out using conventional methods known in the art, which promotes the separation and/or release of cellulose and increased accessibility of the cellulose from ligno-cellulosic material.

5

Pre-treatment techniques are well known in the art and include physical, chemical, and biological pre-treatment, or any combination thereof. In preferred embodiments the pre-treatment of ligno-cellulosic material is carried out as a batch or continuous process.

Physical pre-treatment techniques include various types of milling/comminution (reduction of particle size), irradiation, steaming/steam explosion, and hydrothermolysis, in the preferred embodiment, soaking, removal of the solids from the liquid, steam exploding the solids to create the pre-treated ligno-cellulosic biomass.

Comminution includes dry, wet and vibratory ball milling. Preferably, physical pre-treatment involves use of high pressure and/or high temperature (steam explosion). In context of the invention high pressure includes pressure in the range from 3 to 6 MPa preferably 3.1 MPa. In context of the invention, high temperature include temperatures in the range from about 100 to 300°C, preferably from about 160 to 235 °C. In a specific embodiment impregnation is carried out at a pressure of about 3.1 MPa and at a temperature of about 235 °C. In a preferred embodiment the physical pre-treatment is done according to the process described in WO 2010/113129, the entire teachings of which are incorporated by reference.

Although not needed or preferred, chemical pre-treatment techniques include acid, dilute acid, base, organic solvent,

lime, ammonia, sulfur dioxide, carbon dioxide, pH-controlled hydrothermolysis, wet oxidation, and solvent treatment.

If the chemical treatment process is an acid treatment
5 process, it is more preferably, a continuous dilute or mild acid treatment, such as treatment with sulfuric acid, or another organic acid, such as acetic acid, citric acid, tartaric acid, succinic acid, or any mixture thereof. Other acids may also be used. Mild acid treatment means at least in
10 the context of the invention that the treatment pH lies in the range from 1 to 5, preferably 1 to 3.

In a specific embodiment the acid concentration is in the range from 0.1 to 2.0 wt % acid, preferably sulfuric acid.
15 The acid is mixed or contacted with the ligno-cellulosic material and the mixture is held at a temperature in the range of around 160-220 °C for a period ranging from minutes to seconds. Specifically the pre-treatment conditions may be the following: 165-183 °C, 3-12 minutes, 0.5-1.4% (w/w) acid concentration, 15-25, preferably around 20% (w/w) total solids
20 concentration. Other contemplated methods are described in U.S. Pat. Nos. 4,880,473, 5,366,558, 5,188,673, 5,705,369 and 6,228,177.

25 Wet oxidation techniques involve the use of oxidizing agents, such as sulfite based oxidizing agents and the like. Examples of solvent treatments include treatment with DMSO (Dimethyl Sulfoxide) and the like. Chemical treatment processes are generally carried out for about 5 to about 10 minutes, but
30 may be carried out for shorter or longer periods of time.

Biological pre-treatment techniques include applying lignin-solubilizing micro-organisms (see, for example, Hsu, T.-A.,

1996, Pre-treatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, D.C., 179-212; Ghosh, P., and Singh, A., 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of ligno-cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pre-treating ligno-cellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, D.C., chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B., 1996, Fermentation of ligno-cellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; and Vallander, L., and Eriksson, K.-E. L., 1990, Production of ethanol from ligno-cellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

20

In an embodiment both chemical and physical pre-treatment is carried out including, for example, both mild acid treatment and high temperature and pressure treatment. The chemical and physical treatment may be carried out sequentially or simultaneously.

25

In a preferred embodiment the pre-treatment is carried out as a soaking step with water at greater than 1 °C, removing the ligno-cellulosic biomass from the water, followed by a steam explosion step.

30

In a preferred embodiment the pre-treated ligno-cellulosic material is comprised of complex sugars, also known as glu-

cans and xylans (cellulose and hemicellulose) and lignin.

Enzyme or enzyme mixture

5 A enzyme or enzyme mixture means a cellulolytic enzyme or mixture of enzymes capable of degrading ligno-cellulosic biomass. An enzyme or enzyme mixture produced according to the described process may be of any origin including of bacterial or fungal origin. Chemically modified or protein engineered
10 variants are included. Suitable enzyme or enzyme mixtures include enzyme or enzyme mixtures from the general Cellulomonas, Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium, Chrysosporium, Penicillium, Thermobifida and Trichoderma, e.g., fungal enzyme or enzyme mixtures produced by
15 Humicola insolens, Thermobifida fusca, Cellulomonas fimi, Myceliophthora thermophila, Thielavia terrestris, Fusarium oxysporum, Chrysosporium lucknowense, Penicillium decumbens, and Trichoderma reesei.

20 In an embodiment the enzyme or enzyme mixture produced is an enzyme or enzyme mixture complex homologous to the host cell. In an embodiment the enzyme or enzyme mixture produced is a enzyme or enzyme mixture complex homologous to a host cell of the genus Penicillium, preferably a strain of Penicillium decumbens.
25

It is to be understood that the enzyme or enzyme mixture produced may also be a mono-component enzyme or enzyme mixture, e.g., comprise an endoglucanase, exo-cellobiohydrolase, glucohydrolase, or beta-glucosidase produced recombinantly in a
30 suitable host cell. Suitable host cells are described further below.

71

The enzyme or enzyme mixture produced may also be a enzyme or enzyme mixture preparation where one or more homologous enzyme or enzyme mixture components are deleted or inactivated from the host cell natively producing the enzyme or enzyme mixture.

Host Cell Capable of Producing an Enzyme or Enzyme Mixture

The host cell may be of any origin. As mentioned above the enzyme or enzyme mixture may be homologous or heterologous to the host cell capable of producing the enzyme or enzyme mixture.

The term "recombinant host cell", as used herein, means a host cell which harbours gene(s) encoding enzyme or enzyme mixture and is capable of expressing said gene(s) to produce enzyme or enzyme mixture, wherein the enzyme or enzyme mixture coding gene(s) have been transformed, transfected, transduced, or the like, into the host cell. The transformation, transfection, transduction or the like technique used may be well known in the art. In a preferred embodiment the gene is integrated into the genome of the recombinant host cell in one or more copies.

When the enzyme or enzyme mixture is heterologous the recombinant host cell capable of producing the enzyme or enzyme mixture is preferably of fungal or bacterial origin. The choice of recombinant host cell will to a large extent depend upon the gene(s) coding for the enzyme or enzyme mixture and the origin of the enzyme or enzyme mixture.

The term "wild-type host cell", as used herein, refers to a host cell that natively harbours gene(s) coding for enzyme or

enzyme mixture and is capable of expressing said gene(s).
When the enzyme or enzyme mixture is a homologous preparation
or enzyme or enzyme mixture complex the wild-type host cell
or mutant thereof capable of producing the enzyme or enzyme
5 mixture is preferably of fungal or bacterial origin.

A "mutant thereof" may be a wild-type host cell in which one
or more genes have been deleted or inactivated, e.g., in or-
der to enrich the enzyme or enzyme mixture preparation in a
10 certain component. A mutant host cell may also be a wild-type
host cell transformed with one or more additional genes cod-
ing for additional enzymes or proteins in order to introduce
one or more additional enzyme activities or other activities
into the enzyme or enzyme mixture complex or preparation na-
15 tively produced by the wild-type host cell. The additional
enzyme(s) may have the same activity (e.g., enzyme or enzyme
mixture activity) but merely be another enzyme molecule,
e.g., with different properties. The mutant wild-type host
cell may also have additional homologous enzyme coding genes
20 transformed, transfected, transduced, or the like, prefera-
bly integrated into the genome, in order to increase expres-
sion of that gene to produce more enzyme.

In a preferred embodiment the recombinant or wild-type host
25 cell is of filamentous fungus origin. Examples of host cells
include the ones selected from the group comprising *Acremo-*
nium, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*,
Chrysosporium, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasi-*
dium, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*,
30 *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phane-*
rochaete, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Tala-*
romyces, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, or
Trichoderma cell.

In a more preferred embodiment the filamentous fungal host cell is selected from the group comprising a strain of *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* or *Aspergillus oryzae*. In an even more preferred embodiment, the strain is *Penicillium decumbens*.

In another preferred embodiment the filamentous fungal host cell is a strain of *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, or *Fusarium venenatum* cell. In another preferred embodiment, the filamentous fungal host cell is selected from the group comprising a strain of *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, or *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium lucknowense*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium decumbens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, or *Trichoderma viride*.

30

In another preferred embodiment the recombinant or wild-type host cell is of bacterial origin. Examples of host cells include the ones selected from the group comprising gram posi-

74

tive bacteria such as a strain of Bacillus, e.g., Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus coagulans, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, or Bacillus thuringiensis; or a Streptomyces strain, e.g., Streptomyces lividans or Streptomyces murinus; or from a gram negative bacterium, e.g., E. coli or Pseudomonas sp.

10 Use

In another aspect the process relates to the use of pre-treated ligno-cellulosic material as a carbons source feed for producing an enzyme or enzyme mixture in a host cell.

15

The process also relates to the use of pre-treated ligno-cellulosic material as carbon source in enzyme or enzyme mixture production processes.

The process described and claimed herein is not to be limited in scope by the specific embodiments herein disclosed, since these embodiments are intended as illustrations of several aspects of the invention. Any equivalent embodiments are intended to be within the scope of this invention. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are also intended to fall within the scope of the appended claims. In the case of conflict, the present disclosure, including definitions will be controlling.

30

The process may also have additional steps wherein the enzymes harvested from the process are further used to hydrolyze s first ligno-cellulosic biomass. Preferably first lig-

no-cellulosic biomass and second ligno-cellulosic biomass should be derived from the same grass genus and more preferably derived from the same grass species. It is also preferable that the first ligno-cellulosic biomass upon which the enzymatic hydrolysis is to be conducted be pre-treated prior to enzymatic hydrolysis.

Also discovered is the enzyme or enzyme mixture made by the process described as well as the ligno-cellulosic biomass which has been hydrolyzed by an enzyme or enzyme mixture produced according to the described process. Thus, this process is applicable growing the host cell in the presence of a first pre-treated ligno-cellulosic biomass and then used to treat the second pre-treated ligno-cellulosic biomass and that the first and second pre-treated ligno-cellulosic biomasses can be derived from the group selected from the same plant genus and the same plant species.

Also claimed in this invention is the enzyme produced according to process described and the ligno-cellulosic biomass which has been hydrolyzed by the enzyme or the processes described.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

25

The cultivation of the host cell for the production of enzyme(s) proceeds in the following example.

Each host cell cultivation, which in the first instance used *Penicillium decumbens* as the host cell, started from a spore solution recovered from a PDA-plate seeded with fresh spores seven days before recovery.

- 1) pre-cultivation which is not part of the claimed cul-

tivation process and

2) host cell cultivation wherein the host cell is grown and the enzyme(s) produced.

5 PRECULTIVATION:

Seeding PDA plate:

1. 500 µl of a previously collected spore solution were
dispensed into a PDA plate (3.9% Potato Dextrose Agar
10 medium) prepared as known in the art.
2. 500 µl of sterile 0.9% NaCl solution was dispensed over
the spores and the flask gently rotated until the sur-
face was all covered by the liquid.
3. The flask was closed with a cotton plug covered with an
15 aluminium foil and incubated at 30 °C for 7 days.

Spore Solution Recovery:

4. After 7 days, 10 ml of 0.9% NaCl sterile solution was
dispensed in the flask.
- 20 5. The flask was gently rotated until the liquid became
cloudy.
6. As much volume of the NaCl solution was drawn back as
possible removing the spore suspension to a sterile
tube.
- 25 7. The spore solution can be stored indefinitely at 4 °C

Cultivation Setup Step

Before starting the host cell cultivation it is necessary to
30 set up the cultivation.

Pre-culture medium is prepared as reported below choosing the
volume to be at least one-tenth of that of the host cell cul-

tivation phase :

Pre-Culture Medium Composition	% w/v	g	G
Peptone	1.00%	1.00	10.00
Pre-treated Ligno-cellulosic biomass	2.00%	2.00	20.00
KH ₂ PO ₄	0.30%	0.30	3.00
MgSO ₄	0.05%	0.05	0.50
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.20%	0.20	2.00
CaCO ₃	0.50%	0.50	5.00
Water to add (ml)		98	980
Glucose	1.00%	2.00*	20.00*
Final volume		100	1000

1. The glucose and spore solution are added after sterili-
- 5 zation. Spore solution volume is chosen to obtain a fi-
- nal concentration of 5000 CFU/ml.
2. This pre-culture is incubated at 30°C, 170 rpm for 30h.

Host Cell Cultivation and Enzyme Production:

10

The host cell cultivation environment is prepared as reported the table below.

Host Cell Cultivation Medium composition	% w/v
Pretreated ligno-cellulosic biomass ma- terial [on a dry basis]	4.50%

Urea	0.50%
Tween	0.10%
Glucose (preferably 0.0)	0.4%
	% v/v
Pre-Culture Medium volume from previous step	10.0%

1. After sterilization the pH was corrected to 5.3 and the optional simple sugar (glucose) and pre-culture volume were added. The pH is controlled in flasks using different type of buffer solutions (for example 0.1 M phosphate buffer).
2. Host Cell cultivation and enzyme production were carried out at 30°C setting 170 rpm for flasks and 500 rpm for fermentors. Air supply in fermentors was modified during cell cultivation based upon microorganism requirements.

RESULTS

The following tables compare activity upon the pre-treated ligno-cellulosic biomass used to feed the host cell. The comparative example (CE1) is the enzyme mixture extraction made via traditional methods where the host cell feed is primarily, if not all glucose. The working example (WE1) was produced as described above wherein the vast majority of the sugars consumed by the host cell were derived from the pre-treated ligno-cellulosic biomass. It is clear from the data that when the host cell is cultivated in the presence of ligno-cellulosic biomass, the enzymes produced are far more active to the ligno-cellulosic biomass than enzymes produced from the same host cell strain fed only glucose.

TABLE 1: ENZYME ACTIVITY AFTER 138h

	Total cellulasic	β-Glucosidase	Xylanase
	Activity content after 138h U/ml		
WE1	0.68	3.31	23.86
CE1	0.00	0.34	5.72
	Relative performance, %		
WE1	100%	100%	100%
CE1	0%	18%	8%

It is apparent from Table 1, that the enzymes derived from
5 the host cell fed the ligno-cellulosic biomass are 5 times
more active than those derived from the comparative example.

Table 2 shows the activity development over time of the com-
parative example. As readily apparent, at no time does the
10 activity of the comparative example exceed the activity of
the working example.

TABLE 2: ENZYME ACTIVITY vs TIME

	Time, hrs					
	0	65.7	89.7	113.7	137.7	161.7
	Total cellulasic Activity, U/ml					
WE1	0	0.333685	0.547819	0.733553	0.681827	0.515875
CE1	0	0.013113	0.014792	0	0	0
	Beta-Glucosidase Activity, U/ml					
WE1	0	0.528679	0.667978	2.354583	3.307823	2.851688
CE1	0	0.469901	0.579264	0.46	0.341527	0.501366
	Xylanase Activity, U/ml					
WE1	0	20.79375	15.4646	23.85919	16.96183	13.13234
CE1	0	1.607751	3.45798	5.722076	1.339955	2.678937

15
Tables 3 and 4 show the results of the process as applied to
the various ligno-cellulosic biomasses (corn stover, arundo,
populus, wheat straw, miscanthus, and bagasse) as well as
arundo with the two other listed host cells. This establishes
20 the method for varicus types of host cells and ligno-
cellulosic biomasses.

TABLE 3. Demonstration of P. Decumbens on Different types of ligno-cellulosic biomass

Time, hrs					
	0	66	90	114	138
Fpase Activity, U/ml					
Arundo	0.00	0.49	0.64	0.62	0.83
Corn Stover	0.00	0.34	0.54	0.53	0.51
Populus	0.00	0.31	0.40	0.44	0.52
Wheat Straw	0.00	0.26	0.53	0.47	0.63
Miscanthus	0.00	0.47	0.65	0.78	0.97
Bagasse	0.00	0.37	0.55	0.54	0.81

TABLE 4: Enzyme Production of Different Microorganisms on Arundo:

	FPase Activity, U/ml					
	Time, h					
	0	66	90	114	138	168
Penicillium decumbens	0.00	0.49	0.64	0.62	0.83	
Trichoderma reesei						
RUTC30	0.00	0.62	1.55	1.78	1.90	2.19
Phanerochaete chrysosporium	0.00	0.00	0.001	0.00215	0.006	0.31
Trichoderma reesei						
QM9414	0.00	0.05	0.41	0.63	0.75	0.85

FPase is the enzyme activity tested on Filter paper and then the combined with the activity of exo- endo-cellulases and beta-glucosidase, the Ghose assay.

10

To demonstrate the effect of the added glucose, glucose was added to the cultivation environment in the amount indicated in Table 5 and Table 6. The amount added is the percent by weight of the total cultivation environment. As can be seen

in the table, the amount of enzymatic activity is reduced as the amount of glucose increases. The ratio is the ratio of the amount of optional glucose added to the amount of sugars from the pre-treated ligno-cellulosic material.

5

TABLE 5.

Optional Simple Sugar (Glucose) added (dry weight percent of cul- tivation environment)	Ratio of Sim- ple Su- gars to sugars in bio- mass	Cultivation Time, hrs				
		0	66	90	114	138
FPase Activity, U/ml						
0.0%	0.00	0.000	0.441	0.532	0.576	0.688
0.4%	0.33	0.000	0.306	0.469	0.547	0.653
0.7%	0.53	0.000	0.245	0.382	0.538	0.610
1.4%	1.12	0.000	0.170	0.314	0.557	0.587
2.0%	1.63	0.000	0.091	0.223	0.407	0.472

TABLE 6.

Optional Simple Sugar (Glucose) added (dry weight percent of cul- tivation environment)	Ratio of Sim- ple Su- gars to sugars in bio- mass	Cultivation Time, hrs				
		0	66	90	114	138
Xylanase Activity, U/ml						
0.0%	0.00	0.00	21.68	17.22	15.41	12.83
0.4%	0.33	0.00	18.51	16.88	14.67	10.70
0.7%	0.53	0.00	16.21	17.83	18.94	13.65
1.4%	1.12	0.00	14.85	19.40	29.54	11.11
2.0%	1.63	0.00	10.14	12.44	13.37	12.25

10 The Fpase (filter paper) and Xylanase activity were deter-

mined using industry known methods of determining enzymatic activity. The difference being that filter paper was the substrate for Fpase and the xylan mixture described below used as the Xylan substrate.

5

Code	Substrate	Activity type	Preparation
Main activities			
FiP	Filter paper	Cellulose degrading activity	15 mg Whatman No. 1 filter paper strip (0.55 x 3.29 cm).
Xyl	Xylan	Xylanase	2 g Birchwood xylan (Sigma X0502) 70 ml Ultrapure water Heat to boiling with stirring. Cool to room temperature and add 5 ml of 1 N buffer stock solution

CLAIMS

1. A process which produces at least one enzyme from a host cell for the hydrolysis of a first pre-treated ligno-cellulosic biomass wherein said process comprises the step of
5 cultivating the host cell which is capable of producing the at least one enzyme for a cultivation time, wherein the cultivation of the host cell occurs in a cultivation environment comprising
10 the host cell,
a second pre-treated ligno-cellulosic biomass comprising complex sugars;
the cultivation is done under simple sugar starved conditions of having an amount of optionally added simple sugar or sugars in the range of 0 to 10% by weight of the cultivation environment on a dry basis for a portion of the cultivation
15 time which is at least 50% of the cultivation time;
and
the cultivation environment is substantially void of
20 added vitamins, and/or added minerals, and/or added inducers of enzymes production.
2. The process of claim 1, wherein the dry matter content by weight of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass
25 in the cultivation environment is higher than a value selected from the group consisting of 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 15%.
3. The process of any of claims 1 and 2, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 75% of the cultivation time.
30
4. The process of claim 3, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at

least 85% of the cultivation time.

5. The process of claim 4, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 90% of the cultivation time.

6. The process of claim 5, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 95% of the cultivation time.

10

7. The process of claim 6, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 98% of the cultivation time.

15 8. The process of any of claims 1 and 2, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is the same as the cultivation time.

9. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the amount of optionally added simple sugar or sugars is in the range of 0 to 5% by weight of the cultivation environment on a dry basis.

10. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the amount of optionally added simple sugar or sugars is in the range of 0 to 2.5% by weight of the cultivation environment on a dry basis.

11. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the amount of optionally added simple sugar or sugars is in the range of 0 to 2.0% by weight of the cultivation environment on a dry basis.

12. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the optional added simple sugar or sugars is in the range of 0 to 1.0% by weight of the cultivation environment on a dry basis.

5

13. The process according to any of claims 1 to 8, wherein there is no optional added simple sugar or sugars in the cultivation environment.

10

14. The process of any of claims 1 to 13, wherein the enzyme is harvested by removing the enzyme from the cultivation environment.

15

15. The process of any of claims 1 to 14, wherein the enzyme is further used to hydrolyze the first ligno-cellulosic biomass and the first ligno-cellulosic biomass and the second pretreated ligno-cellulosic biomass both comprise ligno-cellulosic biomass derived from the same grass genus.

20

16. The process of any of claims 1 to 14, wherein the enzyme is further used to hydrolyze the first ligno-cellulosic biomass and the first ligno-cellulosic biomass and the second pretreated ligno-cellulosic biomass are derived from the same grass species.

25

17. The process of any of claims 15 to 16, wherein the wherein first ligno-cellulosic biomass is pre-treated prior to enzymatic hydrolysis.

30

18. An enzyme mixture produced according to any process of claims 1 to 14.

19. A hydrolyzed ligno-cellulosic biomass which has been hy-

drolyzed by the enzyme mixture of claim 18.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/070340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/14 C12N9/24 C12N9/42
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU Y ET AL: "Screening, Identifying of Cellulose-decomposing Strain L-06 and Its Enzyme-producing Conditions", CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,, vol. 24, no. 6, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 1112-1116, XP022939166, ISSN: 1872-2075, DOI: 10.1016/S1872-2075(08)60052-7 [retrieved on 2008-06-01] abstract paragraph [2.3.1] figure 1 ----- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 13 December 2012	Date of mailing of the international search report 19/12/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sonnerat, Isabelle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/070340

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOVACS KRISZTINA ET AL: "Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with Trichoderma atroviride enzymes produced in-house", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON UK, vol. 2, no. 1, 6 July 2009 (2009-07-06), page 14, XP021060600, ISSN: 1754-6834, DOI: 10.1186/1754-6834-2-14 the whole document -----	1-19
X	LEVER M ET AL: "Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 101, no. 18, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 7083-7087, XP027072434, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2010.04.012 [retrieved on 2010-04-28] the whole document -----	1-19

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC1167AG		FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2012/070340	International filing date (day/month/year) 12.10.2012	Priority date (day/month/year) 13.10.2011	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12N1/14			
Applicant C5-6 Italy S.r.l.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>5</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 09.07.2013		Date of completion of this report 24.01.2014	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized officer Sonnerat, Isabelle Telephone No. +31 70 340-8951	



INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2012/070340

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-32 as originally filed

Claims, Numbers

1-17 filed with the letter of

05-12-2013

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This report has been established:
 - ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2012/070340

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-17</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

1 References

Reference is made to the following document:

- D1 LIU Y ET AL: "Screening, Identifying of Cellulose-decomposing Strain L-06 and Its Enzyme-producing Conditions", CHINESE JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 24, no. 6, 1 June 2008, pages 1112-1116

2 Amendments

With letter of 05-12-2013 claim 1 has been limited to the use of *Penicillium decumbens* as host cell.

This amendment does not introduce subject-matter which goes beyond the disclosure in the application as filed.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

3 Novelty (Article 33(2) PCT)

In view of the prior art, claims 1-17 are novel and therefore meet the requirements of Article 33(2) PCT, because a process for the fermentative production of an enzyme for the hydrolysis of a first lignocellulosic biomass with the following features:

- *Penicillium decumbens* as host cell
- a second pre-treated lignocellulosic biomass as carbon source
- an amount of said biomass of more than 4% wt of the dry matter
- simple sugar starved (i.e. glucose free) conditions
- medium being free of vitamins, minerals, lactose and/or IPTG

is not disclosed therein.

4 Inventive Step (Article 33(3) PCT)

However, the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-17 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

- 4.1 D1 represents the prior art closest to the subject-matter of claim 1 and discloses the production of FPase (cellulase), endoglucanase, beta-glucosidase and/or exoglucanase by a *Penicillium decumbens* strain, which is cultured in medium containing 1% of various substrates, among others straw or wheat bran, as sole carbon source. The fermentation medium does not contain vitamins and/or inducers of enzyme production. An increase of enzyme production by inducers is assumed ("will be"), but not disclosed (cf. paragraphs 1.1 and 2.3.1; figure 1).
- 4.2 The subject-matter of claim 1 therefore differs from this known method only in that the amount of lignocellulosic biomass substrate is higher (> 4% wt dry matter).
- 4.3 The problem to be solved by the present invention therefore is the provision of a further method for the production of lignocellulose-hydrolysing enzymes by *Penicillium decumbens* using lignocellulosic biomass as carbon source.
- 4.4 The solution proposed in claim 1 of the present application, namely an amount of more than 4% wt lignocellulose biomass in the cultivation environment, can not be considered inventive (Article 33(3) PCT) for the following reasons:
- 4.5 No unexpected technical effect or advantage is linked to the higher amount of substrate.
- 4.6 The applicant in his letter of 08-07-2013 argues that the increase in dry matter content reduces the energy per gram required for agitating the cultivation environment as well as the amount of cultivation environment needed for the production of a certain amount of enzyme, i.e. reduction of investment costs. This however is not unexpected, but obvious for the person skilled in the art.
- 4.7 D1 is directed to the identification and analysis of a specific *P. decumbens* strain and therefore, enzyme-production by the strain is analysed under laboratory conditions, i.e. with small amounts.
- It would be obvious for the skilled person to use higher amounts of substrate in an enzyme production process as claimed, i.e. in industrial enzyme production.
- 4.8 The applicant argues in his letter of 05-12-2013 that D1 teaches away from the use of lignocellulosic biomass as carbon source, because in the document the peak enzymatic activities of the different enzymes assayed are obtained by using carbon sources of different kind. In particular, the peak values of FPase (cellulase) and BGL (beta-glucosidase) activities are obtained by using glucose as sole carbon source.

94
~~101~~

- 4.9 Indeed, concerning the production of cellulose and beta-glucosidase D1 discloses the opposite than what is shown in the application however, claim 1 is not limited to said enzymes, but refers to the production of hydrolysing enzymes in general.
- 4.10 In view of the teaching of D1 (highest activity of different enzymes depends on kind of carbon source) it can however not be expected that the effect of an increased activity/ production is obtained for any hydrolysing enzyme by using a higher amount (> 4%) of substrate.

Therefore, the subject-matter of claims 1-17 can not be considered inventive (Article 33(3) PCT).

EPO - DG 2

06. 12. 2013

43

TORINO
MILANO
ROMA
MADRID
PARIS
GENEVE
BRESCIA
PADOVA
ALICANTE
KILOMETROROSSO (BG)

Corso Emilia, 8 - 10152 Torino, Italy
P.O. Box 321 - 10121 Torino Centro, Italy
Tel.: (+39) 011.2440311
Fax: (+39) 011.286300 - (+39) 011.286676
jpto@jacobacci.com
www.jacobacci.com

JACOBACCI
&
PARTNERS

- by air courier -

EUROPEAN PATENT OFFICE
P.B. 5818
PATENTLAAN 2
NL-2280 HV RIJSWIJK
NETHERLANDS

PCT Chapter II
MU DG 2

Turin, December 5, 2013
Our ref.: PC1167AG (please always quote)
Our case: E0087433 BEE/AG

Re: International Examination of PCT Patent Application No. PCT/EP2012/070340 in the name of C5-6 ITALY S.r.l.

Dear Sirs,

We are referring to the written opinion issued on October 10, 2013 with regard to the above-captioned patent application.

Please find herewith enclosed a replacement amended set of claims, wherein claim 1 was amended in order to specify - as requested - that the host cell is *P. Decumbens*. The remaining dependent claims are unchanged.

Accordingly, the objections of lack of support and disclosure raised at chapter VIII-5 of the above-captioned written opinion are certainly overcome.

Furthermore, the amended claims are inventive in respect of the prior art, since - as acknowledged also in chapter V-4 of the above-captioned written opinion - the data reported in table 1 of the description irrefutably indicate that the enzyme activity is increased five times when the host cell is *P. Decumbens*, and ligno-cellulosic biomass with high dry weight is used as carbon source, instead of glucose.

Such conclusion is further supported by the closest prior art - i.e. Liu (D1) - which uses, as carbon source, inter alia also ligno-cellulosic biomass. However - as specified in paragraph 2.3.1 of D1 - carbon sources different from ligno-cellulosic biomass gave the best results for the assayed various enzymes. Literally "*when CMC Na was sole carbon source, EG activity reached the peak value; when lactose was the sole carbon source, CBH activity reached the peak value; when glucose was sole carbon source, both FPase and BGL activities reached the peak value*". In other words, D1 teaches plainly away from the use of ligno-cellulosic biomass, since the peak enzymatic activity is obtained, for any enzyme assayed therein, by using carbon sources of different kind.

In view of the above arguments and amendments, we trust that a fully positive

JACOBACCI & PARTNERS S.p.A.

Cap. Soc. Euro 1.000.000 int. vers. - REA n. 281914 della C.C.I.A.A. Torino
n. Pos. Comm. Est.: To006485
Ufficio del Registro delle Imprese Torino n. 00501050017
Cod. fisc./Part. IVA IT00501050017
Sede legale: 10152 Torino, Italy - Corso Emilia, 8
Società soggetta alla direzione e coordinamento da parte della Finpat S.p.A.

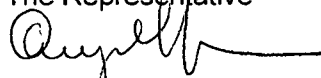
q6
101

JACOBACCI

PARTNERS

international preliminary report on patentability (IPRP) may be shortly issued. Should this not be the case, we would respectfully solicit the issue of a further written opinion.

Yours faithfully,
The Representative


GERBINO Angelo

c/o JACOBACCI & PARTNERS

Encl.:

- amended set of claims 1-17 (in triplicate)

CLAIMS

1. A process which produces at least one enzyme from a host cell for the hydrolysis of a first pre-treated ligno-cellulosic biomass wherein said process comprises the step of
5 cultivating the host cell which is capable of producing the at least one enzyme for a cultivation time, wherein the cultivation of the host cell occurs in a cultivation environment comprising
10 the host cell which is *Penicillium decumbens*,
a second pre-treated ligno-cellulosic biomass comprising complex sugars;
the cultivation is done under simple sugar starved conditions of having an amount of optionally added simple sugar or sugars
15 in the range of 0 to 10% by weight of the cultivation environment on a dry basis for a portion of the cultivation time which is at least 50% of the cultivation time;
the cultivation environment is void of added vitamins, minerals, mineral salts, lactose and isopropyl β -D-1-
20 thiogalactopyranoside; and
the dry matter content by weight of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass in the cultivation environment is higher than 4%.
- 25 2. The process of claim 1, wherein the dry matter content by weight of the second pre-treated ligno-cellulosic biomass in the cultivation environment is higher than a value selected from the group consisting of 6%, 8%, 10%, 15%.
- 30 3. The process of any of claims 1 and 2, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 75% of the cultivation time.

4. The process of claim 3, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 85% of the cultivation time.

5 5. The process of claim 4, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 90% of the cultivation time.

6. The process of claim 5, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 95% of the cultivation time.

7. The process of claim 6, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is at least 98% of the cultivation time.

8. The process of any of claims 1 and 2, wherein the portion of the cultivation time under simple sugar starved conditions is the same as the cultivation time.

9. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the amount of optionally added simple sugar or sugars is in the range of 0 to 5% by weight of the cultivation environment on a dry basis.

10. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the amount of optionally added simple sugar or sugars is in the range of 0 to 2.5% by weight of the cultivation environment on a dry basis.

11. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the amount of optionally added simple sugar or sugars is in the range of 0 to 2.0% by weight of the cultivation

environment on a dry basis.

12. The process according to any of claims 1 to 8, wherein the optional added simple sugar or sugars is in the range of 0
5 to 1.0% by weight of the cultivation environment on a dry basis.

13. The process according to any of claims 1 to 8, wherein there is no optional added simple sugar or sugars in the
10 cultivation environment.

14. The process of any of claims 1 to 13, wherein the enzyme is harvested by removing the enzyme from the cultivation environment.

15
15. The process of any of claims 1 to 14, wherein the enzyme is further used to hydrolyze the first ligno-cellulosic biomass and the first ligno-cellulosic biomass and the second pretreated ligno-cellulosic biomass both comprise
20 lignocellulosic biomass derived from the same grass genus.

16. The process of any of claims 1 to 14, wherein the enzyme is further used to hydrolyze the first ligno-cellulosic biomass and the first ligno-cellulosic biomass and the second
25 pretreated ligno-cellulosic biomass are derived from the same grass species.

17. The process of any of claims 15 to 16, wherein the first ligno-cellulosic biomass is pre-treated prior to enzymatic
30 hydrolysis.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0048376

Bogotá D.C., Mayo 08 de 2014 - 14:18:07

RECIBIDO DE : WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS LTDA

NI 830.029.907

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	632104826	08/05/2014	732.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-098752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-08 14:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 101

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 8 de 2014 - 14:18:08

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

101
101Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0048377

Bogotá D.C., Mayo 08 de 2014 - 14:18:07

RECIBIDO DE : WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS LTDA

NI 830.029.907

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	632104826	08/05/2014	732.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
7	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	217.000.00
				\$217.000.00

SON: **DOSCIENTOS/DIECISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-098752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-08 14:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 101

102

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 8 de 2014 - 14:18:08

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 ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-098752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-08 14:31:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 101