



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 863**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12F 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08872168 .3**

96 Fecha de presentación : **06.11.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2222865**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2010**

54

Título: **Procedimiento de producción de alcohol en un contexto de bio-refinería.**

30

Prioridad: **21.11.2007 FR 07 08173**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.08.2011

73

Titular/es: **IFP Energies Nouvelles**
1 & 4 avenue de Bois-Préau
92852 Rueil Malmaison Cedex, FR

72

Inventor/es: **Margeot, Antoine y**
Monot, Frédéric

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 363 863 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de alcohol en un contexto de bio-refinería

5 **Campo técnico**

La presente invención se inscribe en el campo de la producción de biocarburantes. Esta se refiere más en particular a la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas en el campo de la producción de alcohol a partir de materiales celulósicos o lignocelulósicos (biocarburante de segunda generación).

10 La lógica económica y logística actual quiere que los lugares de producción de biocarburantes de segunda generación sean los mismos que los de producción de primera generación, constituyendo el conjunto una "bio-refinería" en la que la totalidad del vegetal se valoriza. De este modo, a partir de una planta productora de azúcar, se pretende valorizar la caña de azúcar y los residuos lignocelulósicos de la caña.

15 **Antecedentes de la invención**

Desde los años 1970, la transformación de la biomasa lignocelulósica en etanol, tras la hidrólisis de los polisacáridos que la componen en azúcares fermentables, ha sido objeto de numerosos estudios.

20 Los residuos lignocelulósicos están formados en su mayor parte por alrededor de un 40 a un 50 % de celulosa, de un 20 a un 25 % de hemicelulosa y de un 15 a un 25 % de lignina.

De estos tres polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina, la celulosa es la principal fuente de azúcares fermentables en etanol ya que está formada por glucosa, esta última fermentándose con facilidad en etanol mediante *Saccharomyces cerevisiae* en unos procedimientos industriales probados y productivos. Las pentosas que contienen las hemicelulosas no se convierten de manera eficaz en etanol. Otros microorganismos, entre los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Pachysolen*, *Zymomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, se pueden seleccionar para valorizar los azúcares monómeros procedentes de la biomasa en etanol.

30 El procedimiento de transformación de los materiales lignocelulósicos en alcohol comprende una etapa de pretratamiento físico-químico, seguida de una etapa de hidrólisis enzimática o química, de una etapa de fermentación alcohólica de los azúcares liberados y de una etapa de recuperación del alcohol.

La etapa de pretratamiento tiene como objetivo liberar los azúcares contenidos en las hemicelulosas en forma de monómeros, esencialmente pentosas, como la xilosa y la arabinosa, y hexosas, como la galactosa, la manosa y la glucosa, y mejorar la accesibilidad de la celulosa embebida dentro de la matriz de lignina y hemicelulosa. Existen numerosas tecnologías: cocciones ácidas, cocciones alcalinas, explosión de vapor, procedimientos organosolv, etc. La eficacia del pretratamiento se mide por la tasa de recuperación de las hemicelulosas y por la susceptibilidad a la hidrólisis del residuo celulósico. Los pretratamientos ácidos en condiciones suaves y por explosión de vapor son los que mejor se adaptan. Estos permiten una recuperación total de las pentosas y una buena accesibilidad de la celulosa en la hidrólisis.

El residuo celulósico se hidroliza, ya sea por vía ácida, o por vía enzimática con la utilización de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas. Microorganismos como los hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, o las bacterias anaerobias que pertenecen, por ejemplo, al género *Clostridium*, producen estas enzimas, que contienen en particular las celulasas y las xilanasas, adaptadas a la hidrólisis completa de los polímeros que forman los vegetales.

El procedimiento ácido, que se realiza mediante un ácido fuerte, ácido sulfúrico en particular, es eficaz, pero requiere grandes cantidades de productos químicos (ácido y a continuación base para la neutralización). La hidrólisis enzimática no presenta este inconveniente; esta se realiza, por otra parte, en unas condiciones suaves y es eficaz. Por el contrario, el coste de las enzimas sigue siendo muy elevado. Por esta razón, se han hecho muchos estudios para reducir este coste: el aumento de la producción de enzimas, en primer lugar, seleccionando las cepas hiperproductoras y mejorado los procedimientos de fermentación, la reducción de la cantidad de enzimas en hidrólisis a continuación, optimizando la fase de pretratamiento o mejorando la actividad específica de estas enzimas. Durante la última década, los principales estudios se han dedicado a analizar los mecanismos de acción de las celulasas y de expresión de las enzimas con el fin de conseguir excretar el complejo enzimático más apropiado para la hidrólisis de los substratos lignocelulósicos modificando las cepas con las herramientas de biología molecular.

El microorganismo más utilizado para la producción de celulasas es el hongo *Trichoderma reesei*. Las cepas salvajes tienen la capacidad de excretar, en presencia de un sustrato inductor, la celulosa, por ejemplo, el complejo enzimático considerado como el mejor adaptado para la hidrólisis de la celulosa. Las enzimas del complejo enzimático contienen tres grandes tipos de actividades; las endoglucanasas, las exoglucanasas y las celobiasas. Otras proteínas que poseen propiedades indispensables para la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos también se producen mediante *Trichoderma reesei*, las xilanasas, por ejemplo. La presencia de un sustrato inductor es

indispensable para la expresión de las enzimas celolíticas y/o hemicelolíticas. La clase de sustrato carbonado influye de forma determinante en la composición del complejo enzimático. Es el caso de la xilosa, que, asociada a un sustrato carbonado inductor, como la celulosa o la lactosa, permite mejorar de forma significativa la actividad denominada xilanasas.

Las técnicas de genética clásica mediante mutación han permitido la selección de cepas de *Trichoderma reesei* hiperproductoras de celulasas, como las cepas MCG77 (Gallo – patente US 4275 167), MCG 80 (Allen, A. L. y Andreotti, R. E., Biotechnol-Bioengi 1982; 12, 451-459, 1982), RUT C30 (Montenecourt, B. S. y Eveleigh, D. E., Appl. Environ. Microbiol. 1977, 34, 777-782) y CL847 (Durand y otros, 1984, Proc. Colloque SFM “Genética de los microorganismos industriales”, París, H. HESLOT Ed., pág. 39-50). Las mejoras han permitido obtener unas cepas hiperproductoras menos sensibles a la represión catabólica sobre azúcares monómeros en particular, glucosa por ejemplo, con respecto a las cepas salvajes.

Se han obtenido cepas recombinantes a partir de las cepas de *Trichoderma reesei* Qm9414, RutC30, CL847 clonando genes heterólogos, por ejemplo la invertasa de *Aspergillus niger* que permite a la *Trichoderma reesei* utilizar la sacarosa como fuente de carbono. Estas cepas han conservado su hiperproductividad y su aptitud para cultivarse en fermentador.

El procedimiento de producción de celulasas mediante *Trichoderma reesei* ha sido objeto de mejoras importantes con el objetivo de extrapolarlo a la escala industrial.

Para obtener buenas producciones de enzimas, es necesario aportar una fuente de carbono rápidamente asimilable para el crecimiento de *Trichoderma reesei* y un sustrato inductor que permita la expresión de las celulasas y la secreción en el medio de cultivo. La celulosa puede desempeñar estas dos funciones; no obstante, es difícil de utilizar en la etapa industrial y se ha sustituido por fuentes de carbono solubles como la glucosa, la xilosa o la lactosa, la lactosa desempeñando también la función de sustrato inductor. Se han descrito otros azúcares solubles, como la celobiosa y la soforosa, como inductores, pero son demasiado caros para utilizarse en la etapa industrial. No obstante, se ha constatado que las producciones de celulasas mediante *Trichoderma reesei*, con sustratos solubles, son muy inferiores a las que se obtienen sobre celulosa en “batch”. Esto se debe al efecto represor de los azúcares fácilmente asimilables, en alta concentración. La alimentación de forma continua de los sustratos carbonados solubles ha permitido alzar la represión catabólica limitando la concentración residual en los cultivos y optimizando la cantidad de azúcar que permite obtener un mejor rendimiento y una mejor productividad enzimática (véase la patente FR-B-2 555 603 presentada a nombre de la solicitante).

La lactosa continúa siendo, en un procedimiento de producción industrial de enzimas celolíticas, uno de los sustratos más adecuados y uno de los menos caros; no obstante, continúa siendo gravoso y representa alrededor de un tercio del precio de coste de las enzimas. A pesar de todos los progresos que se han realizado, el coste de las enzimas continúa teniendo un puesto importante (de entre un 30 y un 50 %) en la transformación de la biomasa celulósica en alcohol. Además, en el caso de la utilización de lactosa como fuente de carbono para la producción de celulasas, el procedimiento es dependiente de una fuente de carbono exterior. Por esta razón, la utilización de sustratos carbonados procedentes de los procedimientos industriales (como residuos de hemicelulosas hidrolizadas o vinazas de fermentación etanólica) es un avance importante si la fuente de carbono inductora está fácilmente disponible.

La utilización de los residuos de hemicelulosas para la producción de celulasas se ha descrito en la solicitud de patente FR-A-2 881 753 presentada a nombre de la solicitante. Estos residuos son, en efecto, inductores de la producción de celulasas y conducen a unas mezclas eficaces en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. La utilización de estos residuos presenta, no obstante, un cierto número de limitaciones potenciales:

- su utilización impone un pretratamiento en el que se solubilizarán las hemicelulosas;
- una variación de materia prima vegetal, como por ejemplo un simple cambio de variedad corre el riesgo de entrañar una modificación en la composición del residuo y, por esta misma razón, una modificación de la composición en enzimas;
- la presencia de inhibidores, en particular en función del vegetal y de las condiciones de pretratamiento, corre el riesgo de plantear problemas en la reproducibilidad de los cultivos,
- el alto contenido en xilosa de los residuos (procedentes de paja, por ejemplo) induce unas hemicelulasas que no son forzosamente necesarias para hidrolizar un sustrato ya liberado de la gran mayoría de sus hemicelulosas.

Por otra parte, la utilización de vinazas de fermentación de hidrolizados de materia lignocelulósica también se ha descrito en esta solicitud de patente. Los resultados que se obtienen con esta fuente de carbono son equivalentes, e incluso superiores, a las que se obtienen con los sustratos clásicos, pero es posible que las nuevas generaciones de enzimas con las propiedades de hidrólisis mejoradas y las cepas de levaduras adaptadas a las condiciones de fermentación no reduzcan la cantidad de fuente de carbono inductora en una proporción incompatible con la producción de enzimas.

El documento Lawford H. G. y otros (Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, vol. 91-93, páginas 133-146) describe unos exámenes comparativos realizados para la productividad de etanol a partir de biomasa que utilizan diferentes recombinantes de una cepa *Zymomonas mobilis* utilizada para la etapa de fermentación etanólica, esta cepa siendo capaz de co-fermentar la glucosa y la xilosa que están contenidas en los hidrolizados de biomasa. Los hidrolizados que se utilizan se preparan a partir de la paja de avena pretratada mediante explosión de vapor, seguida de la hidrólisis con celulasas. En este documento, se hace referencia al procedimiento de la empresa logen (Canadá) que utiliza el mismo tipo de hidrolizado. Se menciona que un punto de producción de bioetanol de la empresa logen está co-localizado con un punto de producción de enzimas, lo que presenta la ventaja de que la enzima se puede utilizar sin necesidad de estabilización y de preservación y que los azúcares que se producen en el procedimiento se pueden utilizar para la producción de las enzimas.

La utilización de una fuente de carbono de composición reproducible, desprovista de inhibidores y no dependiente o poco dependiente de la materia prima que hay que tratar sería un avance importante. Esta fuente de carbono, estando disponible en el mismo punto, también permite desarrollar el concepto de bio-refinería.

Descripción de la invención

La presente invención describe un procedimiento de producción de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica pretratada en el que la etapa de hidrólisis enzimática se realiza con unas enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas producidas por medio de al menos un efluente procedente de otro procedimiento de producción de etanol que utiliza como materia prima una planta productora de azúcar, dicho efluente comprendiendo unos jugos azucarados procedentes de los lavados de remolachas o de cañas de azúcar, y/o de melazas de la industria azucarera, la producción de enzimas realizándose con unas cepas de microorganismo celulolítico que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, que utilizan la sacarosa como fuente de carbono para su crecimiento, de forma natural o tras su modificación.

Descripción de las figuras

La figura 1 describe un esquema del procedimiento de transformación para la producción de alcohol de acuerdo con la presente invención.

La figura 2 describe un esquema del procedimiento de transformación para la producción de alcohol de acuerdo con la presente invención que utiliza como materia prima lignocelulósica los residuos de una planta productora de azúcar.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de efluentes que se obtienen a lo largo de otros procedimientos de producción de biocarburantes, por ejemplo, pero no de forma exclusiva, los jugos azucarados procedentes de los lavados de remolacha o de cañas de azúcar, o las melazas de la industria azucarera para la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas, con unas cepas de microorganismo celulolítico que utilizan la sacarosa como fuente de carbono, de forma natural o tras su modificación.

El microorganismo celulolítico pertenece a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum* y de forma preferente a la especie *Trichoderma reesei*.

Los jugos azucarados que contienen la sacarosa que se ha utilizado en la presente invención proceden de procedimientos de producción de biocarburantes de primera generación y se obtienen del lavado de remolachas o de cañas de azúcar, o proceden de las melazas de industrias azucareras.

La fuente de carbono principal puede ser la sacarosa procedente de estos jugos, o ser un complemento para un azúcar soluble industrial, como la lactosa o la xilosa, o un extracto de la fracción hemicelulósica en forma de monómeros procedente de la biomasa pretratada, o un extracto de vinazas de fermentación de productos de hidrólisis de biomasa lignocelulósica, o una mezcla de estos. Estos dos últimos extractos también pueden servir como inductores de la producción de celulasas.

Un objetivo de la invención es proponer una fuente de carbono fácilmente disponible, que permita producir enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas en las actividades apropiadas para la hidrólisis de la biomasa celulósica, compatible con varios esquemas de procedimientos de producción de bioalcohol en diferentes contextos.

La fuente de carbono para el crecimiento, principalmente de la sacarosa, se obtiene a partir de jugos azucarados tras el lavado mediante difusión de pulpas de remolachas, o a partir de melaza tras el refinado del azúcar. Del mismo modo, se pueden utilizar jugos azucarados o melazas procedentes del lavado de cañas de azúcar.

La etapa específica de la preparación del mosto a partir de plantas sacaríferas es la extracción de la sacarosa. Este azúcar se encuentra en estado libre en el interior de las vacuolas de las células del vegetal. Su extracción se hace

ya sea mediante un prensado, o bien mediante un lavado con agua caliente, practicado a contracorriente sobre el vegetal previamente cortado.

5 De este modo, las remolachas se lavan por lo general para retirarles la tierra, y a continuación se cortan en cosetas. Se extrae a continuación un jugo azucarado mediante difusión con agua caliente. Este primer jugo se destina de forma habitual para fermentación etanólica, pero se puede utilizar, concentrado o no en forma de sirope, en la presente invención como fuente carbono para la producción de celulasas. Las melazas, subproductos del refinado del azúcar, que contienen hasta un 50 % en peso de sacarosa, también se pueden utilizar (tabla 2).

10 En el caso de la caña de azúcar, las cañas se trituran y se prensan añadiéndoles agua caliente para solubilizar los azúcares. El jugo azucarado, eventualmente concentrado, sigue a continuación un trayecto similar al del proceso de la remolacha.

15 Tabla 1: Composición a título indicativo de los jugos azucarados procedentes de la difusión con agua caliente de las remolachas y de la trituración y el prensado de las cañas de azúcar. La proporción de impurezas se reduce, por lo general, mediante filtración y/o precipitación de las sales.

	Jugo azucarado de remolacha	Jugo azucarado de caña de azúcar
Materia seca (% en peso)	15	20
Azúcares totales (% MS)	94	> 90
de los cuales Sacarosa (% MS)	94	85
de los cuales Glucosa (% MS)	0	7,5
de los cuales Fructosa (% MS)	0	7,5
Otros (% MS)	6	< 10

20 Tabla 2: Composición química a título indicativo de melazas de remolacha y de caña de azúcar (fuentes: INRA y Yang y otros (2007))

	Melaza de remolacha	Melaza de caña de azúcar
Materia seca (% en peso)	73	73
Materias minerales (% MS)	13	14
Materias nitrogenadas totales (% MS)	15	6
Azúcares totales (% MS)	64	64
de los cuales Sacarosa (% MS)	64	43
de los cuales Glucosa (% MS)	0	10,5
de los cuales Fructosa (% MS)	0	10,5
Calcio (g/kg MS)	3,7	7,4
Fósforo (g/kg MS)	0,3	0,7
Potasio (g/kg MS)	82	40

25 La biomasa lignocelulósica utilizada se selecciona entre la paja, la madera, los cultivos forestales, los residuos de plantas productoras de alcohol, productoras de azúcar o productoras de cereal, los residuos de la industria papelera y los productos de transformación de los materiales celulósicos y lignocelulósicos.

30 En el modo de realización que se representa en la figura 2, los residuos lignocelulósicos proceden de la planta productora de azúcar a partir de la cual se obtienen los jugos azucarados para la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

35 La materia prima lignocelulósica experimenta un pretratamiento que puede ser de cualquier tipo, con hidrólisis o no de las hemicelulosas. Tras el pretratamiento, la fracción celulósica, liberada o no de la fracción hemicelulósica hidrolizada y, llegado el caso, de la lignina, se hidroliza mediante las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas producidas por las cepas especializadas, las celulasas de *Trichoderma reesei* siendo las más eficaces y las más apropiadas cuando los sustratos carbonados proceden de la biomasa celulósica o lignocelulósica. Dichas enzimas se producen por medio de al menos un efluente procedente de otro procedimiento de etanol tal y como se ha descrito con anterioridad.

El material que hay que hidrolizar se pone en suspensión en fase acuosa a razón de entre un 6 y un 40 % de materia seca, de preferencia entre un 20 y un 30 %. El pH se ajusta entre 4 y 5,5, de preferencia entre 4,8 y 5,2, y la temperatura entre 40 y 60 °C, de preferencia entre 45 y 50 °C. La reacción de hidrólisis se inicia con la adición de las celulasas; la cantidad que se utiliza de forma habitual es de entre 10 y 30 mg de proteínas excretadas por gramo de sustrato pretratado o menos. La reacción dura, por lo general, de 15 a 48 horas según la eficacia del pretratamiento, la composición de la mezcla de celulasas y la cantidad de enzimas añadidas. A la reacción le sigue la dosificación de los azúcares liberados, en particular la glucosa. La solución azucarada se separa de la fracción sólida no hidrolizada, formada esencialmente por lignina, mediante filtración o centrifugación; esta se utiliza para la fermentación etanólica.

Por lo general, el alcohol se separa del mosto de fermentación mediante destilación y el residuo está formado por vinazas de destilación. Estas vinazas ricas en inductor se pueden utilizar como fuente de carbono inductora para la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas, tal y como se describe en la solicitud de patente FR-A-2 881 753.

Las cepas que se utilizan para la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas son cepas de hongos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum* y de forma preferente a la especie *Trichoderma reesei*. No obstante, algunos de los hongos que pertenecen a estos géneros, en particular el *Trichoderma reesei*, no pueden utilizar la sacarosa como fuente de carbono. Es, por lo tanto, necesario recurrir a cepas genéticamente modificadas, por ejemplo exprimiendo la invertasa de *A. niger*, tal y como describe Berges y colegas, Curr Genet., 1993, Jul-Ag 24 (1-2): 53-59, para la *Trichoderma reesei*, con el fin de que la sacarosa se pueda utilizar como fuente de carbono. De forma independiente, las cepas se pueden modificar para mejorar las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas mediante los procedimientos de mutación-selección, como por ejemplo la cepa IFP CL847 (patente francesa FR-B-2 555 803); las cepas mejoradas mediante las técnicas de recombinación genética también se pueden utilizar.

Estas cepas se cultivan en fermentadores agitados y aireados en unas condiciones compatibles con su crecimiento y con la producción de las enzimas. Según su clase, el sustrato carbonado seleccionado para la obtención de la biomasa se introduce en el fermentador antes de la esterilización o se esteriliza de forma separada y se introduce en el fermentador tras la esterilización de este último para tener una concentración inicial de entre 20 y 35 g·l⁻¹. La fuente inductora puede no añadirse en esta fase. Se prepara una solución acuosa que contiene el sustrato seleccionado para la introducción de las enzimas con una concentración de 200-250 g·l⁻¹; esta solución debe contener el sustrato inductor. Esta se inyecta cuando se agota el sustrato inicial de tal manera que aporte una cantidad optimizada, comprendida entre 35 y 45 mg·g⁻¹ de células ("fed batch"). La concentración residual de azúcar en el medio de cultivo es inferior a 1 g·l⁻¹ durante esta fase de "fed batch".

A la etapa de hidrólisis enzimática le sigue una etapa de fermentación, y a continuación una etapa de destilación y de separación del alcohol que se obtiene.

En el caso de la fermentación etanólica, el alcohol que se obtiene es el etanol.

En el caso de una fermentación de tipo acetobutílica o ABE, se obtiene al finalizar el proceso una mezcla de alcoholes formada por butanol y por etanol. Este tipo de fermentación se realiza mediante unas bacterias que pertenecen al género *Clostridium* y, de forma más específica, a la especie *Clostridium acetobutylicum*.

De la misma forma, si la fermentación es de tipo IBE, aplicando la cepa *Clostridium beijerinckii*, se obtiene una mezcla formada por isopropanol, por butanol y por etanol.

La etapa de hidrólisis enzimática y de fermentación se puede realizar de forma simultánea (procedimiento SSF por Simultaneous Saccharification and Fermentation), y a continuación le sigue una etapa de destilación y de separación del alcohol que se obtiene.

El ejemplo 1 se da a título comparativo y el ejemplo 2 ilustra la invención, sin limitar su alcance.

Ejemplo 1: Producción de enzimas sobre lactosa

La producción de celulasas se realiza en un fermentador agitado mecánicamente. El medio tiene la siguiente composición: KOH 1,66 g·l⁻¹, H₃PO₄ 85 % 2 ml·l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 2,8 g·l⁻¹, MgSO₄ 7 H₂O 0,6 g·l⁻¹, CaCl₂ 0,6 g·l⁻¹, MnSO₄ 3,2 mg·l⁻¹, ZnSO₄ 7 H₂O 2,8 mg·l⁻¹, CoCl₂ 4,0 mg·l⁻¹, FeSO₄ 7 H₂O 10 mg·l⁻¹, Corn Steep 1,2 g·l⁻¹, antiespumante 0,5 ml·l⁻¹.

El fermentador que contiene 1,75 l de medio mineral y 70 g de lactosa se esteriliza a 120 °C, y a continuación se siembra con 0,25 l de un precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. El medio del precultivo, adicionado con ftalato de potasio a 5 g·l⁻¹ para controlar las variaciones de pH, es idéntico al del fermentador. El crecimiento del hongo en precultivo se realiza sobre lactosa, con una concentración de 30 g·l⁻¹. El crecimiento de la sustancia inoculada dura de 2 a 3 días y se realiza a entre 27 y 30 °C en una mesa agitadora.

Tras 46 horas de crecimiento, el sustrato inicial del fermentador se agota y la solución de lactosa a 250 g·l⁻¹ se inyecta de forma continua con un flujo de 4,5 ml·h⁻¹ hasta 142 horas.

5 La temperatura se regula a 27 °C durante la fase de crecimiento de la biomasa, y luego a 25 °C hasta el final del cultivo. El pH se regula a 5 durante la fase de crecimiento, luego a 4 hasta el final del cultivo mediante la adición de una solución de amoníaco que aporta el nitrógeno necesario para la síntesis de las proteínas excretadas. El contenido en oxígeno disuelto se mantiene por encima de entre un 15 y un 20 % por acción sobre la aireación y la agitación.

10 A la producción de enzimas le sigue la dosificación de las proteínas extracelulares mediante el método de Folin (Lowry), tras la separación del micelio mediante filtración o centrifugación. Las actividades celulolíticas están determinadas por el método de la actividad sobre papel de filtro (UPF: unidad de papel de filtro) para una actividad global y la actividad celobiasa, actividad considerada como limitante del proceso de hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica. La actividad UPF se mide sobre papel Whatman n° 1 con una concentración inicial de 50 g·l⁻¹; se determina la muestra para ensayo de la solución enzimática que hay que analizar que libera el equivalente a 2 g·l⁻¹ de glucosa (dosificación colorimétrica) en 60 minutos. La actividad celobiasa se mide sobre celobiosa a una concentración de 20 mM; se determina la muestra para ensayo que libera 0,5 g·l⁻¹ de glucosa (dosificación enzimática) en 30 minutos.

20 Las actividades en U·ml⁻¹ se expresan en micromoles de glucosa liberados por minuto y por mililitro de solución enzimática.

25 Las determinaciones analíticas sobre el mosto final dan los siguientes resultados:

Sustrato consumido g·l ⁻¹	79,6
Biomasa g·l ⁻¹	13,5
Proteínas mg·ml ⁻¹	37,8
UPF U·ml ⁻¹	22,1
Celobiasas U·ml ⁻¹	25,2

Ejemplo 2: Producción de enzimas sobre sacarosa

30 La producción de enzimas se realiza en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, pero la lactosa se sustituye en la fase batch por sacarosa y el fed-batch se realiza con una solución del 60 % de lactosa y el 40 % de sacarosa. La cepa que se utiliza es una cepa derivada de CL847 transformada con la invertasa de *A. niger* (Bergès y otros, 1993).

35 El fermentador que contiene 1,75 l de medio mineral con 40 g de sacarosa puro se siembra con 0,25 l de un precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. El sustrato carbonado del precultivo es la glucosa con una concentración de 20 g·l⁻¹. Tras 48 horas de crecimiento, y tras agotarse el sustrato inicial, la solución del 60 % de lactosa y del 40 % de sacarosa en 200 g·l⁻¹ se inyecta de forma continua con un flujo de 5 ml·h⁻¹ hasta 165 horas.

Las determinaciones analíticas sobre el mosto final dan los siguientes resultados:

Sustrato consumido g·l ⁻¹	71,9
Biomasa g·l ⁻¹	12,2
Proteínas mg·ml ⁻¹	32
UPF U·ml ⁻¹	23
Celobiasas U·ml ⁻¹	34

40 Las producciones de enzimas que se obtienen son parecidas en términos de rendimiento y de actividades enzimáticas. Estos valores son compatibles con la realización de una eficaz hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica. Esta hidrólisis enzimática y la fermentación darán para los dos ejemplos unos resultados similares en términos de producción de alcoholes.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica pretratada en el que la etapa de hidrólisis enzimática se realiza con unas enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas producidas utilizando al menos un efluente procedente de otro procedimiento de producción de etanol que utiliza como materia prima una planta productora de azúcar, dicho efluente comprendiendo unos jugos azucarados procedentes de los lavados de remolachas o de cañas de azúcar, y/o de las melazas de la industria azucarera, la producción de enzimas realizándose con cepas de microorganismos celulolíticos que pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, utilizando la sacarosa como fuente de carbono para su crecimiento, de forma natural o tras su modificación.
- 10
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas se realiza con unos hongos que utilizan, además, como fuente de carbono inductora otro azúcar soluble industrial o un extracto de la fracción hemicelulósica en forma de monómeros que proceden de la biomasa pretratada o un extracto de vinazas de fermentación de productos de hidrólisis de biomasa lignocelulósica o una mezcla de estos.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2 en el que el microorganismo pertenece a la especie *Trichoderma reesei*.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en el que la biomasa lignocelulósica se selecciona entre la paja, la madera, los cultivos forestales, los residuos de plantas productoras de alcohol, productoras de azúcar o productoras de cereal, los residuos de la industria papelera y los productos de transformación de los materiales celulósicos y lignocelulósicos.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en el que a la etapa de hidrólisis enzimática le sigue una etapa de fermentación, y a continuación una etapa de destilación y de separación del alcohol.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la etapa de fermentación es de tipo fermentación etanólica y el alcohol que se obtiene es etanol.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la etapa de fermentación es de tipo fermentación ABE y el alcohol que se obtiene es una mezcla de butanol y de etanol.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la etapa de fermentación es de tipo fermentación IBE y el alcohol que se obtiene es una mezcla de butanol, de etanol y de isopropanol.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en el que la hidrólisis enzimática y la fermentación se realizan de forma simultánea y les sigue una etapa de destilación y de separación del alcohol.

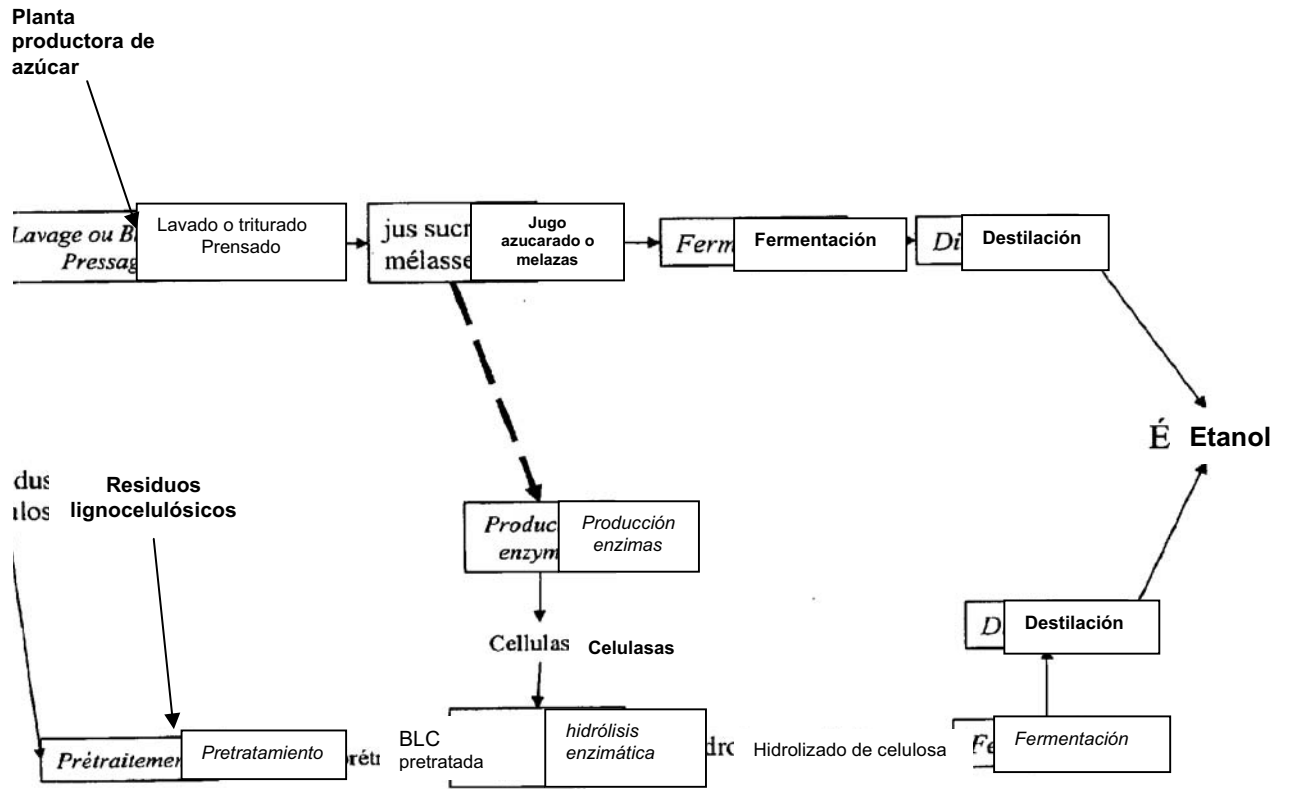
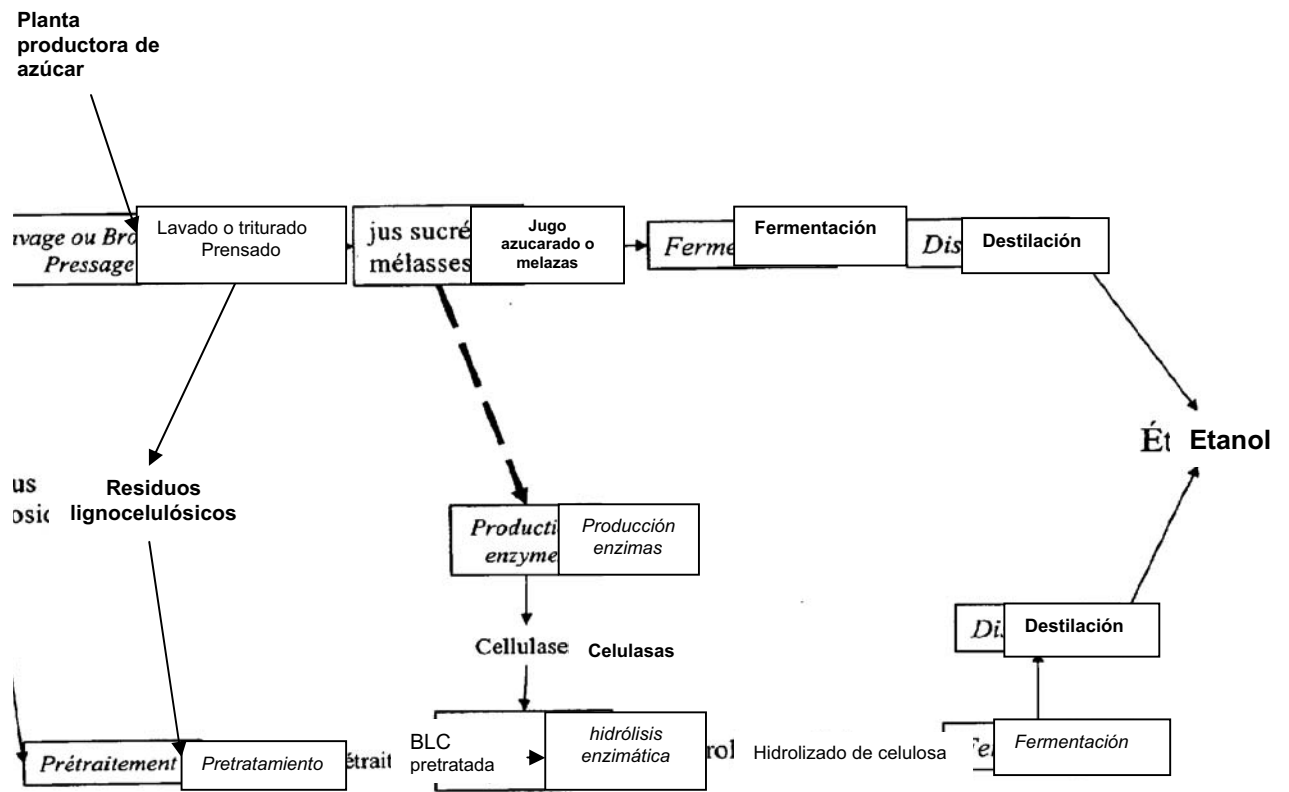


Figura 1



Figur Figura 2