

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 390**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10

(2006.01)

C12N 9/36

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08872760 .7**

96 Fecha de presentación: **16.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2235192**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2010**

54

Título: **COMPLEMENTACIÓN DEL SECRETOMA DE TRICHODERMA REESEI QUE LIMITA LAS CONTAMINACIONES MICROBIOLÓGICAS EN EL MARCO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL MEDIANTE FERMENTACIÓN.**

30

Prioridad:
20.12.2007 FR 0709120

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2011

73

Titular/es:
**IFP ENERGIES NOUVELLES
1 & 4 AVENUE DE BOIS-PRÉAU
92852 RUEIL MALMAISON CÉDEX, FR**

72

Inventor/es:
**LOPES FERREIRA, Nicolas y
MARGEOT, Antoine**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

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).

ES 2 369 390 T3

DESCRIPCIÓN

Complementación del secretoma de trichoderma reesei que limita las contaminaciones microbiológicas en el marco de la producción de etanol mediante fermentación

Campo de la invención

La presente invención se inscribe en el marco de un procedimiento llamado de "segunda generación" de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, que comprende etapas de pretratamiento de un sustrato celulósico o lignocelulósico, de hidrólisis enzimática del sustrato pretratado y después de fermentación alcohólica del hidrolizado obtenido.

Estudio de la técnica anterior

La biomasa lignocelulósica representa uno de los recursos renovables más abundantes en la tierra, y ciertamente uno de los menos costosos. Los sustratos considerados son muy variados, ya que se refieren a la vez a los sustratos leñosos (frondosos y resinosos), los sub-productos de la agricultura (paja) o los de las industrias generadoras de residuos lignocelulósicos (industrias agroalimentarias, papeleras).

La biomasa lignocelulósica está compuesta por tres polímeros principales: celulosa (del 35 al 50%), hemicelulosa (del 20 al 30%) que es un polisacárido esencialmente constituido por pentosas y por hexosas y lignina (del 15 al 25%) que es un polímero de estructura compleja y de alto peso molecular, compuesto por alcoholes aromáticos unidos por enlaces éter.

Estas diferentes moléculas son responsables de las propiedades intrínsecas de la pared vegetal y se organizan en un entramado complejo.

La celulosa y eventualmente las hemicelulosas son las dianas de la hidrólisis enzimática pero no son directamente accesibles a las enzimas. Ésta es la razón por la cual estos sustratos deben experimentar un pretratamiento que precede a la etapa de hidrólisis enzimática. El pretratamiento pretende modificar las propiedades físicas y fisicoquímicas del material lignocelulósico, con la intención de mejorar la accesibilidad de la celulosa pegada a la matriz de lignina y de hemicelulosa. Éste también puede liberar los azúcares contenidos en las hemicelulosas en forma de monómeros, esencialmente pentosas, como xilosa y arabinosa, y hexosas, como galactosa, manosa y glucosa.

El pretratamiento debe, en caso ideal, ser rápido y eficaz, con fuertes concentraciones de sustratos, y las pérdidas de materia deben ser mínimas. Existen numerosas tecnologías: pueden mencionarse las cocciones ácidas, las cocciones alcalinas, la explosión al vapor (Pourquié, J. y Vandecasteele, J.P. (1993) "Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et fermentation". Biotechnologie, 4^a edición, René Scriban, coordinador de Lavoisier TEC & DOC, París, 677-700.), los procedimientos Organosolv, o también las tecnologías de doble tornillo que combinan acciones térmica, mecánica y química (Ogier J.-C. et al. (1999) "Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique" Oil & Gas Science and Technology 54: 67-94). La eficacia del pretratamiento se mide mediante la susceptibilidad a la hidrólisis del residuo celulósico y la tasa de recuperación de las hemicelulosas. Desde un punto de vista económico, parece preferible que el pretratamiento conduzca a una hidrólisis total de las hemicelulosas, para recuperar las pentosas y eventualmente valorizarlas por separado de la fracción celulósica. Los pretratamientos ácidos en condiciones suaves y mediante explosión al vapor están bien adaptados. Estos permiten una recuperación importante de los azúcares procedentes de las hemicelulosas y una buena accesibilidad de la celulosa a la hidrólisis.

El residuo celulósico obtenido se hidroliza por vía enzimática mediante 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 particularmente celulasas y hemicelulasas, adaptadas a la hidrólisis total de la celulosa y de las hemicelulosas.

La hidrólisis enzimática se realiza en condiciones suaves (temperatura del orden de 45-50°C y pH de 4,8) y es eficaz. Por el contrario, en términos de procedimiento, el coste de las enzimas sigue siendo muy elevado. Debido a esto, se han realizado muchos trabajos para reducir este coste: i) en primer lugar, aumento de la producción de enzimas, seleccionando cepas hiperproductoras y mejorando los procedimientos de fermentación, ii) a continuación, disminución de la cantidad de enzimas en hidrólisis, optimizando la fase de pretratamiento o mejorando la actividad específica de estas enzimas. Durante el último decenio, los principales trabajos se han vinculado a la comprensión de los mecanismos de acción de las celulasas y de expresión de las enzimas para hacer excretar el complejo enzimático más apropiado para la hidrólisis de los sustratos lignocelulósicos, modificando las cepas con las herramientas de biología molecular.

Los hongos filamentosos, como organismos celulolíticos, presentan un gran interés para los industriales ya que

tienen la capacidad de producir enzimas extracelulares en una cantidad muy grande. El microorganismo más utilizado para la producción de celulasas es el hongo *Trichoderma reesei*. Las cepas silvestres tienen la facultad de producir, en presencia de un sustrato inductor, por ejemplo celulosa, un secretoma (conjunto de las proteínas secretadas) adaptado a la hidrólisis de la celulosa. Las enzimas del complejo enzimático contienen tres grandes tipos de actividades: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Otras proteínas que poseen propiedades indispensables para las hidrólisis de los materiales lignocelulósicos también son producidas por *Trichoderma reesei*, por ejemplo xilanasas. La presencia de un sustrato inductor es indispensable para la expresión de las enzimas celolíticas y/o hemicelulolíticas. La naturaleza del sustrato carbonado tiene una fuerte influencia sobre la composición del complejo enzimático. Éste es el caso de la xilosa que, asociada a un sustrato carbonado inductor como la celulosa o la lactosa, permite mejorar significativamente la actividad llamada xilanasas.

Las técnicas de genética convencional mediante mutagénesis permitieron la selección de cepas de *Trichoderma reesei* hiperproductoras de celulasas tales 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 et al, 1984, Proc. Colloque SFM "Génétique des microorganismes industriels". París. H. HESLOT Ed, págs. 39-50). Las mejoras permitieron obtener cepas hiperproductoras, menos sensibles a la represión catabólica en azúcares particularmente monómeros, por ejemplo glucosa, que las cepas silvestres.

La trivialización de las técnicas genéticas, que pretenden expresar genes heterólogos en estas cepas fúngicas, ha abierto también el camino hacia la utilización de estos microorganismos como huéspedes para la producción industrial. Las nuevas técnicas de estudios de los perfiles enzimáticos, han hecho posible la creación de cepas fúngicas huéspedes muy eficaces para la producción de enzimas recombinantes a escala industrial [Nevalainen, H. y Teo, V.J.S. (2003) Enzyme production in industrial fungi-molecular genetic strategies for integrated strain improvement. En Applied Mycology and Biotechnology (Vol. 3) Fungal Genomics (Arora, D.K. y Kchachaturians, G.G., eds), págs. 241-259, Elsevier Science]. Uno de los ejemplos de este tipo de modificaciones es la producción de celulasas obtenidas de una cepa de *T. reesei* [Harkki, A. et al. (1991) Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles. Enzyme Microb. Technol. 13, 227-233; Karhunen, T. et al. (1993) High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol. Gen. Genet. 241, 515-522].

Los azúcares obtenidos mediante hidrólisis de la biomasa lignocelulósica son pentosas (xilosa y arabinosa principalmente), disacáridos (celobiosa) y glucosa. Este último es fácilmente transformado en etanol por la levadura *S. cerevisiae* utilizada por el conjunto de las industrias de la fermentación alcohólica. Actualmente, ningún otro microorganismo alcanza sus prestaciones en glucosa en condiciones no estériles, es decir un rendimiento del orden de 0,47 g de etanol por gramo de glucosa, una productividad superior o igual a 5 g/lxh, y concentraciones finales de etanol cercanas al 10% en volumen. *S. cerevisiae* presenta numerosas ventajas suplementarias que resultan de muchos años de selección: resistencia al etanol, fácil empleo a nivel industrial, etc. Por el contrario, las pentosas son fermentadas raramente por los microorganismos y, cuando lo son, las prestaciones son mediocres. Estos últimos años, muchos trabajos han tratado sobre la investigación y/o la mejora de las cepas que fermentan activamente las pentosas a etanol. Se han estudiado cuatro tipos de microorganismos: las levaduras que fermentan de forma natural las pentosas, cepas recombinadas de *S. cerevisiae*, bacterias termófilas o mesófilas que utilizan las pentosas.

La fermentación alcohólica en condiciones no estériles presenta un riesgo importante de contaminaciones del fermentador por microorganismos oportunistas. Las fuentes de contaminación pueden ser de naturaleza viva o no viva. Sin embargo, en este documento nos ceñiremos a fuentes de contaminación vivas. Entre estas fuentes, se encuentran principalmente levaduras y bacterias. Estos microorganismos utilizan los nutrientes presentes, entre ellos la fuente de carbono, y son responsables de la formación de co-productos indeseables como ácido láctico, ácido acético o incluso acetona y butanol. Encontramos este tipo de microorganismos en todas partes en las que las condiciones permiten su crecimiento, es decir en presencia de un mínimo de nutrientes. En este documento se menciona que sus exigencias nutricionales son: una fuente de carbono (generalmente los azúcares), una fuente de aminoácidos (constituyentes de las proteínas), algunas vitaminas y oligoelementos.

Además, en las materias primas energéticas previstas, por ejemplo la paja de trigo, es perfectamente probable encontrar microorganismos capaces de contaminar el procedimiento.

De este modo, en el procedimiento actual y no estéril de producción de etanol de segunda generación, dos etapas son sensibles a una eventual contaminación microbiológica: la etapa de hidrólisis enzimática y la etapa de fermentación. Las soluciones conocidas actualmente para luchar contra la contaminación láctica consisten en rebajar el pH a un valor que favorece el desarrollo de las levaduras en detrimento de las bacterias lácticas. Las levaduras son, sin embargo, menos activas a estos pH ácidos. Otra posibilidad es introducir inhibidores de contaminación bacteriana, como por ejemplo flúor, antibióticos o sulfitos, durante la etapa de fermentación alcohólica. Es, en efecto, durante esta etapa del procedimiento que la concentración de contaminantes es mayor. La utilización de anti-bacterianos convencionales tiene un coste relativamente elevado y requiere efectuar reactivaciones bastante frecuentes del proceso de fermentación.

Limitar los riesgos de contaminación constituye un ahorro potencial de tiempo y de dinero para procedimientos

industriales de dicha amplitud y no hay que despreciar ninguna solución para remediar este problema.

La contaminación bacteriana es, en efecto, un problema principal en la producción de etanol mediante fermentación. Las bacterias están presentes de forma natural en la herramienta de producción y utilizan los nutrientes presentes en el medio, entrando por consiguiente en concurrencia con las levaduras utilizadas en el procedimiento. El crecimiento y la viabilidad de las células de levaduras resultan, por lo tanto, fuertemente afectadas por la presencia de estas bacterias y su rendimiento final en alcohol también se reduce.

En general, las bacterias lácticas fermentan azúcares presentes en los mostos de fermentación y su crecimiento está favorecido por condiciones anaerobias. Éstas se desarrollan generalmente a un pH de 5,5 pero pueden sobrevivir a un pH de hasta pH 3,0. Estas bacterias oportunistas pueden desarrollarse en un amplio intervalo de temperatura y son tolerantes a fuertes concentraciones de alcohol en el medio. La presencia de las bacterias en los procedimientos de producción de etanol de segunda generación debe prohibirse. Cualquier mejora del procedimiento que conduzca a una limitación máxima de esta contaminación debe tomarse en consideración.

Descripción de las figuras

La figura 1 proporciona una representación del mapa esquemático de un plásmido que puede utilizarse para la expresión heteróloga del gen *h/z* por *T. reesei* en condiciones de inducción de celulasas.

Resumen de la invención

La presente invención describe un procedimiento de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica en el que se complementa el genoma de *Trichoderma reesei* con la lisozima.

Descripción detallada de la invención

En el procedimiento de producción de etanol de segunda generación descrito en la presente invención, para prevenir las contaminaciones microbiológicas, se utiliza para producir las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas una cepa fúngica modificada genéticamente que pertenece al género *Trichoderma* y que sobreexpresa, con ayuda de técnicas genéticas bien conocidas por el especialista en la técnica, la lisozima.

La cepa fúngica (microorganismo celulolítico) pertenece preferiblemente a la especie *Trichoderma reesei*.

La utilización de la lisozima, que es una proteína que tiene propiedades anti-microbianas, permite asegurar una protección contra un amplio abanico de bacterias Gram positivas, particularmente contra las bacterias lácticas. Estas bacterias se desarrollan en los procedimientos de producción de etanol de segunda generación desde la etapa de hidrólisis enzimática y principalmente durante la fermentación alcohólica, ya que la temperatura durante esta etapa es del orden de 30 a 35°C.

Además, el hecho de complementar el genoma de *Trichoderma reesei* directamente con la lisozima permite evitar introducir un agente bactericida externo en el procedimiento de producción de etanol, siendo esta cepa la ya utilizada para la hidrólisis enzimática.

De forma muy preferida, la lisozima utilizada para complementar el genoma de *Trichoderma reesei* es la lisozima humana o de pollo.

La lisozima es una enzima de tipo hidrolasa (ácida y secretada por los leucocitos) descubierta por Alexander Fleming en 1922. Se trata de una proteína globular de 129 aminoácidos que se encuentra en cierto número de secreciones (lágrimas, saliva...). También puede extraerse de la clara de huevo, lo que caracteriza su utilización en enología. Utilizada desde hace varios años en las industrias farmacéuticas y agroalimentarias, se añadió poco después en algunos procesos de enología (por ejemplo, maduración del vino) para controlar la contaminación por las bacterias lácticas. Esta enzima actúa degradando su pared (hidroliza los enlaces covalentes entre el ácido N-acetil murámico con el cuarto átomo de carbono de la N-acetil glucosamina). Desde un punto de vista bioquímico, la lisozima posee una actividad óptima entre 40 y 45°C, lo que es completamente compatible con las temperaturas utilizadas para la hidrólisis enzimática, y puede seguir siendo activa hasta 62°C. En lo que concierne al pH óptimo, la actividad enzimática de esta proteína no resulta o resulta muy poco perturbada dentro de un intervalo de pH comprendido entre 3,5 y 7, pero puede seguir siendo activa, sin embargo, a entre 2 y 10.

La lisozima también se emplea como conservante en muchos productos alimentarios susceptibles de contener bacterias lácticas como quesos, tofu o sake. La utilización de la lisozima en los procedimientos de fabricación de cerveza ha llamado muy recientemente la atención y las aplicaciones en las etapas de elaboración de cerveza son numerosas. La lisozima es eficaz contra todas las bacterias lácticas. Además, la levadura y las bacterias Gram negativas no son atacadas por este agente antimicrobiano.

La lisozima presenta también la ventaja de limitar el uso del SO₂, producto utilizado muy a menudo actualmente para limitar las contaminaciones microbiológicas en los procedimientos industriales, pero costoso. La lisozima también puede desempeñar un papel protector en caso de finales de fermentación difíciles. En efecto, las carencias de nitrógeno hacen a los finales de fermentación alcohólica difíciles con riesgo de desarrollo de bacterias lácticas que

degradan las osas aún no fermentadas. La adición de lisozima permite prevenir o tratar este tipo de problemas, con una gran eficacia.

En el caso del procedimiento de producción de etanol por vía biológica de acuerdo con la presente invención, la ventaja principal reside en que la lisozima es una proteína que puede ser expresada directamente por *Trichoderma reesei*.

La expresión heteróloga de lisozima humana se desarrolló en el hongo filamentoso *Tolypocladium geodes* (Michel Baron "Optimisation au niveau moléculaire de souches transformées de *Tolypocladium geodes* pour la sécrétion de deux protéines humaines d'intérêt thérapeutique, (1991), Tesis doctoral de la universidad Paul Sabatier).

En la óptica de una complementación del genoma de *T. reesei* por el gen *h/z* que expresa la lisozima, se realiza una construcción plasmídica modelo utilizando los métodos convencionales de biología molecular conocidos por el especialista en la técnica. La construcción genética a integrar en el genoma de *T. reesei* comprende la secuencia codificante de la lisozima humana insertada entre los elementos que permiten su expresión y la secreción en el hongo. En el marco de una producción conjunta con las celulasas, las secuencias de nucleótidos deben permitir la expresión heteróloga del *h/z*. El promotor, la secuencia señal y el terminador que rodean a este gen deben comprender, por lo tanto, uno o más motivos que el especialista en la técnica sabe que están implicados en la inducción específica de estas enzimas. En particular, el promotor fúngico utilizado puede seleccionarse, de forma no exclusiva entre los siguientes: *gpd* (*A. nidulans*), *cbh1*, *egl1*, *egl2*, *xyn1*. La secuencia señal fúngica puede seleccionarse por ejemplo entre *cbh1*, *egl1*, *egl2*, *xyn1*. Puede utilizarse una fusión de la lisozima con una proteína que facilita la exportación (por ejemplo, Sh-Ble), como se ha descrito en la tesis de M. Baron. El terminador fúngico puede ser de cualquier naturaleza, por ejemplo *cbh1* o *TrpC* (*A. nidulans*).

La construcción debe permitir finalmente identificar la cepa que tenga integrado este gen de la lisozima. Para ello, varios genes, que otorgan resistencia a un antibiótico (fleomicina, higromicina, etc.) o que permiten un cribado mediante auxotrofia (gen *amds* para acetamida), son conocidos por el especialista en la técnica y pueden ser empleados para las cepas industriales de *T. reesei*.

Un ejemplo de construcción plasmídica que permite dicha expresión se describe en la figura 1. En esta figura, las leyendas utilizadas son las siguientes: "Prom" para promotor, "Term" para terminador, "bact" para bacteria, "ss + HLZ" para gen que codifica la lisozima con secuencia de dirección funcional para *T. reesei*, "Sh ble" para el gen que otorga resistencia al antibiótico fleomicina.

La construcción realizada de este modo permite la selección de un transformante gracias a la incorporación, se incorpora a continuación al genoma de la cepa fúngica ya utilizada para producir las celulasas, por ejemplo la cepa hiperproductora CL847 (Durand et al., 1984) de acuerdo con los procedimientos ya descritos y bien conocidos por el especialista en la técnica, por ejemplo descrito por Penttilä et al. (1987).

Los transformantes obtenidos se seleccionan para una fuerte actividad de lisozima, de acuerdo con el método descrito anteriormente por M. Baron (1991, Tesis doctoral Universidad Paul Sabatier, Toulouse).

La cepa seleccionada secreta además de las enzimas celulolíticas una proporción de lisozima entre el 1 y el 5% de las secreciones proteicas de la cepa lo que, en el marco de una hidrólisis enzimática tipo, por ejemplo realizada a 20 mg/g de sustrato y al 20% de materia seca, permite situarse a una concentración de lisozima en la reacción de hidrólisis situada entre 40 y 200 mg/l, que son proporciones empleadas habitualmente en la industria para prevenir las contaminaciones por bacterias lácticas.

Las enzimas se producen a continuación de acuerdo con un procedimiento convencional que puede ser de cualquier naturaleza. Las enzimas se separan y se utilizan para la reacción de hidrólisis como se ha descrito anteriormente. No hay que tomar ninguna otra precaución para evitar las contaminaciones bacterianas para el resto del procedimiento, al contrario de lo que debe hacerse con una cepa convencional.

La acción del agente bactericida en tanto más eficaz cuanto menor es la concentración de bacterias lácticas en el medio. En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, el agente bactericida es producido por el microorganismo utilizado para la secreción de las enzimas empleadas durante la etapa de hidrólisis enzimática. Ahora bien, en esta fase del procedimiento, debido a las condiciones operatorias de temperatura particularmente, la proliferación láctica sigue siendo poco probable o limitada, en comparación con la que puede tener lugar durante la siguiente etapa de fermentación alcohólica.

Los materiales celulósicos o lignocelulósicos utilizados en el procedimiento de acuerdo con la presente invención se seleccionan entre paja, madera, cultivos forestales, residuos de plantas alcoholígenas, azucareras y cerealeras, los residuos de la industria papelera y los productos de transformaciones de los materiales celulósicos y lignocelulósicos.

El material a hidrolizar se suspende en fase acuosa a razón del 6 al 25% de materia seca, preferiblemente del 10 al

- 20%, el pH se ajusta a entre 4 y 5,5 (preferiblemente entre 4,5 y 5,2) y la temperatura a entre 40 y 60°C (preferiblemente entre 45 y 50°C). La reacción de hidrólisis dura generalmente de 15 a 48 horas de acuerdo con la eficacia del pretratamiento realizado, la composición del cóctel enzimático y la cantidad de enzimas añadidas. La reacción se monitoriza mediante dosificación de los azúcares liberados. La solución azucarada obtenida se separa a
- 5 continuación de la fracción no hidrolizada mediante filtración o centrifugado, y a continuación se utiliza para la fermentación etanólica. La etapa de fermentación etanólica se realiza de acuerdo con los conocimientos generales del especialista en la técnica, en presencia de levaduras como por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o *Zymomonas mobilis*, estando la temperatura óptima de fermentación en general comprendida entre 30-35°C.
- 10 De acuerdo con la presente invención, la utilización para producir las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas de una cepa de *Trichoderma reesei* modificada genéticamente y que sobreexpresa, puede realizarse en un procedimiento en el cual la etapa de hidrólisis enzimática es distinta de la etapa de fermentación.
- 15 De acuerdo con otra realización, el procedimiento de acuerdo con la presente invención es un procedimiento SSF (sacarificación y fermentación simultáneas) que consiste en realizar la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica en una sola etapa. En este caso, la temperatura de funcionamiento es relativamente baja (aproximadamente 34°C) y, por consiguiente, más propicia a la contaminación bacteriana.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de etanol a partir de materiales celulósicos o lignocelulósicos que comprende etapas de pretratamiento de un sustrato celulósico o lignocelulósico, de hidrólisis enzimática del sustrato pretratado y a continuación de fermentación alcohólica del hidrolizado obtenido, en el que se utiliza para producir las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas, una cepa fúngica modificada genéticamente que pertenece al género *Trichoderma* y que sobreexpresa la lisozima.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa fúngica pertenece a la especie *Trichoderma reesei*.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que los materiales celulósicos o lignocelulósicos se seleccionan entre paja, madera, cultivos forestales, residuos de plantas alcoholígenas, azucareras y cerealeras, residuos de la industria papelera y productos de transformaciones de los materiales celulósicos y lignocelulósicos.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de hidrólisis enzimática tiene lugar a una temperatura comprendida entre 40 y 60°C y a un pH que varía entre 4 y 5,5.
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 etanólica.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de hidrólisis enzimática y la fermentación etanólica se realizan simultáneamente.

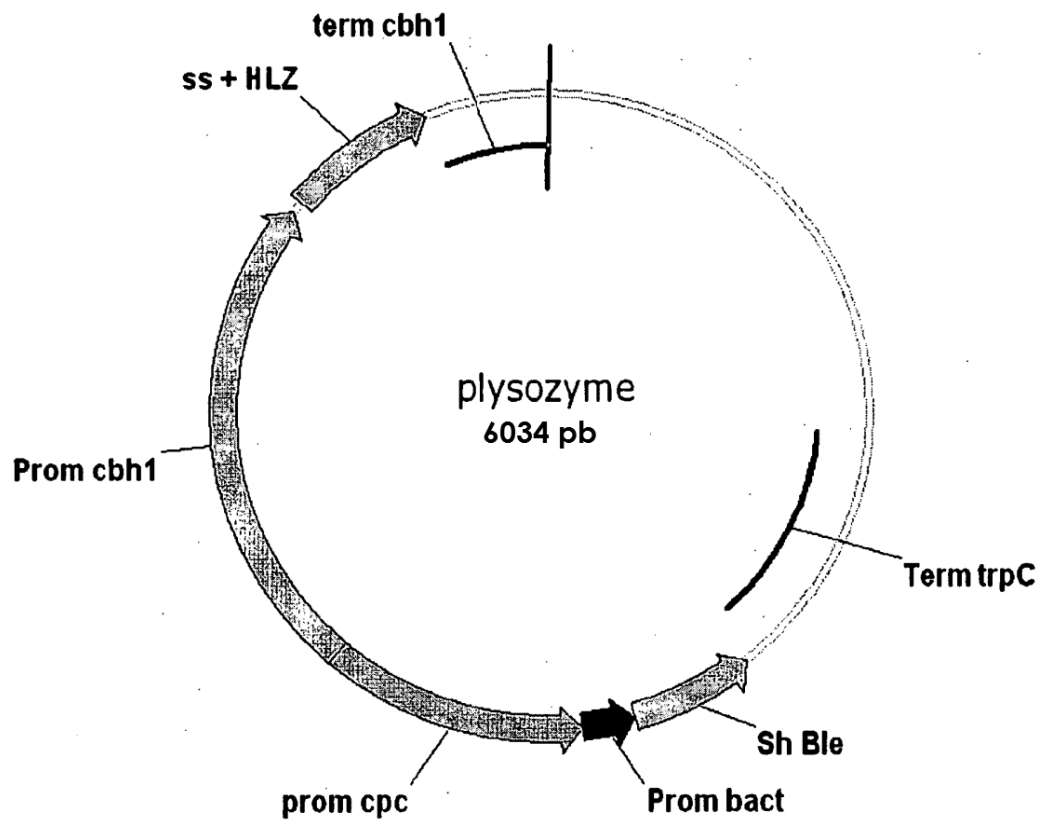


FIGURA 1