

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 636**

51 Int. Cl.:
C12P 7/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06290147 .5**

96 Fecha de presentación: **20.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1690944**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y HEMICELULOLÍTICAS UTILIZANDO LOS RESIDUOS DE DESTILACIÓN DE FERMENTACIÓN ETANÓLICA DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE MATERIALES (LIGNO)CELULÓSICOS.**

30 Prioridad:
09.02.2005 FR 0501371

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT FRANÇAIS DU PÉTROLE
1 & 4 AVENUE DE BOIS-PRÉAU
92852 RUEIL MALMAISON CEDEX, FR**

72 Inventor/es:
**Warzywoda, Michel;
Ballerini, Daniel y
Monot, Frédéric**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 376 636 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 enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas utilizando los residuos de destilación de fermentación etanólica de hidrolizados enzimáticos de materiales (ligno)celulósicos

La presente invención se relaciona con la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas, en el marco de la producción de etanol a partir de materiales celulósicos o lignocelulósicos, donde se utiliza el residuo constituido por los vinotes de destilación, tras separación del etanol, como fuente de carbono inductora o total para la producción de las enzimas celulolíticas.

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

Las maderas de árboles hojosos y las pajas de cereales son los sustratos más utilizados. Están constituidas en su mayor parte por aproximadamente un 40 a un 50% de celulosa, un 20 a un 25% de hemicelulosa y un 15 a un 25% de lignina.

Son utilizables otros recursos, cultivos forestales dedicados, residuos de plantas alcoholígenos, azucareros y de cereales, residuos de la industria papelera y productos de transformación de los materiales celulósicos y lignocelulósicos.

De estos tres polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina, la celulosa es la principal fuente de azúcares fermentables en etanol, ya que está constituida por glucosa, siendo esta última fácilmente fermentada en etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en procedimientos industriales probados y competentes. Las pentosas contenidas en las hemicelulosas no se convierten eficazmente en etanol. Se pueden seleccionar otros microorganismos entre los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Pachysolen*, *Zymomonas*, *Klebsiella* y *Escherichia* para valorizar los azúcares monoméricos procedentes de la biomasa en etanol.

El procedimiento de transformación de los materiales lignocelulósicos en etanol (véase la Figura 1) comprende una etapa de pretratamiento fisicoquímico, seguida de una etapa de hidrólisis enzimática o química, de una etapa de fermentación etanólica de los azúcares liberados y de una etapa de recuperación del etanol.

La etapa de pretratamiento tiene por objeto 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 enganchada en la matriz de lignina y hemicelulosas. Existen numerosas tecnologías: cocciones ácidas, cocciones alcalinas, explosión al vapor, procedimientos organosolv, etc. Se mide la eficacia del pretratamiento por la tasa de recuperación de las hemicelulosas y por la susceptibilidad a la hidrólisis del residuo celulósico. Los pretratamientos ácido en condiciones suaves y por explosión al vapor son los mejor adaptados. Permiten una recuperación total de las pentosas y una buena accesibilidad de la celulosa a la hidrólisis.

El residuo celulósico es hidrolizado ya sea por vía ácida, ya sea por vía enzimática con la utilización de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas. Microorganismos como los hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, o las bacterias anaerobias pertenecientes, por ejemplo, al género *Clostridium*, producen estas enzimas, que contienen especialmente las celulasas y las xilanasas, adaptadas para la hidrólisis total de los polímeros que constituyen los vegetales.

La vía ácida, efectuada con ayuda de un ácido fuerte, el ácido sulfúrico especialmente, es eficaz pero requiere de importantes cantidades de productos químicos (ácido y luego base para la neutralización). La hidrólisis enzimática no presenta este inconveniente; se efectúa, por otra parte, en condiciones suaves y es eficaz. Por el contrario, el coste de las enzimas sigue siendo muy elevado. Por ello, se han realizado muchos trabajos para reducir este coste: el aumento de la producción de enzimas en primer lugar, seleccionando las cepas hiperproductoras y mejorando los procedimientos de fermentación, y la disminución de la cantidad de enzimas en la hidrólisis a continuación, optimizando la fase de pretratamiento o mejorando la actividad específica de estas enzimas. En el curso de la última década, los principales trabajos están ligados a la comprensión de los mecanismos de acción de las celulasas y de expresión de las enzimas con el fin de hacer excretar el complejo enzimático más apropiado para la hidrólisis de los sustratos 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 facultad 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 son igualmente producidas por *Trichoderma reesei*, las xilanasas por ejemplo. La presencia de un sustrato inductor es indispensable para la expresión de las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas. La naturaleza del sustrato carbonado tiene una fuerte influencia sobre la composición del complejo enzimático. Es el caso de la xilosa, que,

asociada a un substrato carbonado inductor como la celulosa o la lactosa, permite mejorar significativamente la actividad llamada xilanasa.

Las técnicas de genética clásica por mutación han permitido la selección de cepas de *Trichoderma reesei* hiperproductoras de celulasas, tales como las cepas MCG77 (Gallo – patente EE.UU. 4.275.167), 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", Paris, H. HESLOT Ed., pp. 39-50). Los mejoramientos han permitido obtener cepas hiperproductoras, menos sensibles a la represión catabólica sobre azúcares monoméricos especialmente, glucosa por ejemplo, con respecto a las cepas salvajes.

Se han obtenido cepas recombinantes a partir de las cepas de *Trichoderma reesei* Qm9414, RutC30 y CL847 clonando genes heterólogos, por ejemplo la invertasa de *Aspergillus niger*, para diversificar la fuente de carbono necesaria para la producción de celulasas, y/o sobreexpresando la celobiasa con el fin de mejorar el rendimiento de la hidrólisis enzimática, considerándose las celobiasas como las enzimas limitantes en la reacción. Estas cepas han conservado su hiperproductividad y su aptitud para ser cultivadas en fermentador.

El procedimiento de producción de celulasas por *Trichoderma reesei* ha sido objeto de mejoramientos importantes con vistas a la extrapolación a escala industrial.

Para obtener buenas productividades en enzimas, es necesario aportar una fuente de carbono rápidamente asimilable para el crecimiento de *Trichoderma reesei* y un substrato inductor que permita la expresión de las celulasas y la secreción en el medio de cultivo. La celulosa puede desempeñar estos dos papeles; sin embargo, es difícil de utilizar a nivel industrial y se la ha substituido por fuentes de carbono solubles, glucosa, xilosa o lactosa, teniendo igualmente la lactosa el papel de substrato inductor. Se han descrito otros azúcares solubles, como la celobiosa y la soforosa, como inductores, pero son demasiado costosos para ser utilizados a nivel industrial. Se ha constatado, sin embargo, que las producciones de celulasas por *Trichoderma reesei*, con substratos solubles, son muy inferiores a las obtenidas sobre celulosa en "batch". Esto es debido al efecto represor de los azúcares fácilmente asimilables, a gran concentración. La alimentación de forma continua de los substratos carbonados solubles ha permitido levantar 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).

La lactosa constituye, en un procedimiento de producción industrial de enzimas celulolíticas, uno de los substratos más apropiados y uno de los más baratos; sigue siendo, no obstante, costoso y representa aproximadamente un tercio del precio de coste de las enzimas. A pesar de todos los progresos realizados, el coste de las enzimas sigue siendo un puesto importante en la transformación de la biomasa celulósica en etanol, de un 30 a un 50%; además, en el caso de la utilización de lactosa como fuente de carbono para la producción de celulasas, el procedimiento depende de una fuente de carbono exterior. Por ello, la utilización de substratos carbonados procedentes de la hilera, por ejemplo las hemicelulosas hidrolizadas, es una vía de progreso importante si la fuente de carbono inductora es de fácil disponibilidad.

El artículo de David J.Gregg y John N. Saddler publicado en la revista Biotechnology and Bioengineering, Vol. 51, pp. 375-383 (1996), describe un procedimiento de producción de etanol a partir de substratos lignocelulósicos en el cual se reciclan las enzimas utilizadas para la hidrólisis varias veces con el fin de minimizar los costes.

El artículo de K. Jun-suk et al. publicado en J. Microbiol. Biotechnol. (1999), 9 (3), 297-302, describe un procedimiento de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica en el cual se realizan simultáneamente las etapas de hidrólisis enzimática y de fermentación etanólica en un mismo reactor. Se reciclan las levaduras y las enzimas utilizadas en este procedimiento al final de cada ciclo para aumentar la producción de etanol. La separación de las enzimas y de las levaduras se realiza utilizando dos membranas diferentes.

El artículo de A.R.Navarro et al. publicado en Waste Management 20 (2000), 581-585, describe un procedimiento de bioconcentración de vinotes procedentes de la fermentación alcohólica de melazas de cañas de azúcar. Se concentran estos residuos para limitar la cantidad de desechos producidos.

La patente US-5.98.233 describe un procedimiento de fabricación de un complejo enzimático rico en xilanasa utilizando como inductor y fuente de carbono un residuo de destilería de cereales pretratado. Se utiliza el complejo enzimático producido como aditivo alimentario en alimentación animal.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con la utilización del residuo obtenido tras la fermentación etanólica de los azúcares monoméricos de los hidrolizados enzimáticos de biomasa celulósica, como fuente de carbono inductora para la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas con cepas de hongo celulolítico, las pertenecientes al género *Trichoderma reesei*, en el marco de la producción de etanol a partir de materiales celulósicos o

lignocelulósicos. La fuente de carbono principal puede ser un azúcar soluble industrial, por ejemplo la glucosa, la lactosa o la xilosa, o un extracto de la fracción hemicelulósica en forma de monómeros procedentes de la biomasa pretratada. También se puede utilizar el residuo como fuente de carbono total, es decir, para el crecimiento del microorganismo y la inducción del sistema de expresión. Esta fuente de carbono es utilizable por las cepas mejoradas genéticamente y especialmente las cepas recombinantes.

Un objeto de la invención es proponer una fuente de carbono inductora o total fácilmente disponible, que permite producir enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas con actividades apropiadas para la hidrólisis de la biomasa celulósica. El esquema de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas a partir de residuos de fermentación etanólica según la invención está representado en la Figura 2. Esta invención permite además la valorización interna de coproductos no valorizables en etanol.

Se realiza una primera etapa de pretratamiento de la biomasa para mejorar la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de la fracción celulósica e hidrolizar la fracción hemicelulósica. El método más apropiado es la explosión al vapor en condiciones ácidas. En condiciones óptimas, de 150 a 250°C durante varios minutos, transforma las hemicelulosas en monómeros minimizando las pérdidas, especialmente en furfural, siendo la xilosa el azúcar mayoritario. Los azúcares liberados pueden ser extraídos por lavado en fase acuosa; el residuo sólido de la extracción no contiene entonces más que celulosa y lignina. Tras la extracción, los azúcares liberados son utilizados para la producción de enzimas como fuente de carbono principal o valorizados en etanol por fermentación con las cepas apropiadas.

La fracción celulósica, liberada o no de la fracción hemicelulósica hidrolizada, y si es el caso de la lignina, es hidrolizada por las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas producidas por las cepas especializadas, siendo las celulasas de *Trichoderma reesei* las más eficaces y las más apropiadas cuando los substratos carbonados proceden de la biomasa celulósica o lignocelulósica. Se suspende el material que se ha de hidrolizar en fase acuosa a razón de un 6 a un 25% de materia seca, preferentemente de un 10 a un 20%, y se ajusta el pH a entre 4 y 5,5, preferentemente entre 4,8 y 5,2, y la temperatura a entre 40 y 60°C, preferentemente entre 45 y 50°C. La reacción de hidrólisis se pone en marcha por adición de las celulasas; la cantidad habitualmente utilizada es de 10 a 30 mg de proteínas excretadas por gramo de substrato pretratado. La reacción dura generalmente de 15 a 48 horas según la eficacia del pretratamiento, la composición de la mezcla de celulasas y la cantidad de enzimas añadidas. La reacción es seguida por dosificación de los azúcares liberados, especialmente la glucosa. Se separa la solución azucarada de la fracción sólida no hidrolizada, esencialmente constituida por lignina, por filtración o centrifugación; se utiliza para la fermentación etanólica. Cuando la fracción celulósica se ha liberado de las hemicelulosas hidrolizadas en la etapa de tratamiento, la glucosa es el azúcar mayoritario retirado en esta etapa. El residuo de la fermentación etanólica, tras la separación del etanol, es utilizado como fuente de carbono inductora o como fuente de carbono principal para la producción de enzimas. La concentración de este residuo es ajustada para obtener la concentración en fuente de carbono mejor adaptada al procedimiento de producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas.

En general, se separa el etanol del mosto de fermentación por destilación y el residuo está constituido por los vinotes de destilación.

Las cepas utilizadas para la producción de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas son cepas de hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Schizophyllum*, preferentemente pertenecientes a la especie *Trichoderma reesei*. Las cepas industriales más competentes son las cepas pertenecientes a la especie *Trichoderma reesei*, modificadas para mejorar las enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas por los procedimientos de mutación-selección, como por ejemplo la cepa IFP CL847 (patente francesa FR-B-2.555.803); también se pueden utilizar las cepas mejoradas por las técnicas de recombinación genética.

Estas cepas son cultivadas en fermentadores agitados y aireados en condiciones compatibles con su crecimiento y la producción de las enzimas. Según su naturaleza, el substrato carbonado seleccionado para la obtención de la biomasa es introducido en el fermentador antes de la esterilización o se esteriliza por separado y se introduce en el fermentador tras la esterilización de este último para tener una concentración inicial de 20 a 35 g.L⁻¹; la fuente inductora puede no ser añadida en esta fase. Se prepara una solución acuosa que contiene el substrato seleccionado para la producción de las enzimas a una concentración de 200-250 g.L⁻¹; esta solución debe contener el substrato inductor. Se inyecta tras el agotamiento del substrato inicial para aportar 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".

Entre los ejemplos que vienen a continuación, se dan los Ejemplos 1 a 3 a título indicativo y los Ejemplos 4 y 5 ilustran la invención.

Ejemplo 1: Producción de enzimas sobre lactosa

Se efectúa la producción de celulasas en fermentador agitado mecánicamente. El medio tiene la composición siguiente: 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

ES 2 376 636 T3

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.

5 Se esteriliza el fermentador que contiene 1,75 L de medio mineral y 70 g de lactosa a 120°C y se siembra luego con 0,25 litros de un precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. El medio del precultivo, al que se ha añadido ftalato de potasio a 5 g.L⁻¹ para controlar las variaciones de pH, es idéntico al del fermentador. Se realiza el crecimiento del hongo en precultivo sobre lactosa, a una concentración de 30 g.L⁻¹. El crecimiento del inóculo dura de 2 a 3 días y se efectúa a entre 27 y 30°C sobre una mesa de agitación.

10 Después de 46 horas de crecimiento, el sustrato inicial del fermentador se agota y se inyecta la solución de lactosa a 250 g.L⁻¹ de forma continua a un caudal de 4,5 mL.h⁻¹ hasta 142 horas.

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

20 La producción de enzimas va seguida de la dosificación de las proteínas extracelulares por el método de Folin (Lowry), tras separación del micelio por filtración o centrifugación. Se determinan las actividades celulolíticas por el método de la actividad en 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. Se mide la actividad UPF sobre papel Whatman del n° 1 a una concentración inicial de 50 g.L⁻¹; se determina la captación de ensayo de la solución enzimática que se ha de analizar que libera el equivalente de 2 g.L⁻¹ de glucosa (dosificación colorimétrica) en 60 minutos. Se mide la actividad celobiasa sobre celobiasa a una concentración de 20 mM; se determina la captación de ensayo que libera 0,5 g.L⁻¹ de glucosa (dosificación enzimática) en 30 minutos.

25 Se expresan las actividades en U.mL⁻¹ en micromoles de glucosa liberadas por minuto y por mililitro de solución enzimática.

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

Substrato 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 xilosa

35 Se realiza la producción de enzimas en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1.

40 Se siembra el fermentador que contiene 1,75 L de medio mineral con 40 g de xilosa pura con 0,25 litros de un precultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. El sustrato carbonado del precultivo es la glucosa a una concentración de 20 g.L⁻¹. Después de 27 horas de crecimiento, tras el agotamiento del sustrato inicial, se inyecta la solución de xilosa a 200 g.L⁻¹ de forma continua a un caudal de 5 mL.h⁻¹ hasta 164 horas.

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

Substrato consumido g.L ⁻¹	63,7
Biomasa g.L ⁻¹	15,3
Proteínas mg.mL ⁻¹	6,1
UPF U.ml ⁻¹	1,7
Celobiasas U.mL ⁻¹	1,9

45 Ejemplo 3: Producción de enzimas sobre una mezcla de lactosa-xilosa al 25-75% respectivamente

En este ejemplo, se utiliza la lactosa como sustrato inductor y se inyecta únicamente en la fase de producción de enzimas, tras el agotamiento de la xilosa inicial.

50 Se realiza la fermentación en las mismas condiciones que en el Ejemplo 2. Se substituye la solución de sustrato inyectada para la producción de enzimas por una mezcla de lactosa y de xilosa a una concentración de 200 g.L⁻¹, siendo la concentración de lactosa de 50 g.L⁻¹. Se detiene la inyección a las 164 horas.

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

Substrato consumido g.L ⁻¹	62,7
Biomasa g.L ⁻¹	11,9
Proteínas mg.mL ⁻¹	34,2
UPF U.ml ⁻¹	10,1
Celobiasas U.mL ⁻¹	8,7

Ejemplo 4: Producción de enzimas sobre xilosa utilizando el residuo producido por fermentación etanólica de un hidrolizado enzimático parcial de un material celulósico tratado y del que se han eliminado las pentosas como fuente inductora

5 Se realiza la fermentación en las mismas condiciones que en el Ejemplo 2. Se realiza la producción de biomasa en "batch" con 20 g.L⁻¹ de xilosa. Se realiza la producción de enzimas en "fed batch" con una solución preparada a partir de un residuo al que se añade xilosa. Se prepara la solución de residuo, referenciada como H1, de la forma siguiente:

10 Se recogen 6 kg de material sólido húmedo, obtenido tras tratamiento de paja de trigo por explosión al vapor en condiciones ácidas y extracción de las pentosas, o sea, 1,4 kg de materia seca tratada y lavada, en 0,75 litros de tampón acetato de sodio 0,5 M a pH 4,8 y 0,75 litros de una solución de celulasas comerciales, o sea, 30 g de proteínas. Después de una hidrólisis enzimática de 24 horas, realizada en un reactor agitado mecánicamente y mantenido a 50°C, se separa la suspensión por centrifugación. La fracción líquida recuperada contiene 92 g.L⁻¹ de glucosa, 10,3 g.L⁻¹ de xilosa y 1,0 g.L⁻¹ de arabinosa. Se realiza una fermentación etanólica sobre esta fracción por *Saccharomyces cerevisiae*. Se prepara el inóculo, de un volumen de 0,4 L, en frasco agitado sobre glucosa con una levadura de pan. La glucosa del hidrolizado se fermenta totalmente para formar etanol. Se libera al mosto obtenido de las proteínas y de la levadura por calentamiento a 100°C y centrifugación. Después de concentrar a vacío, se obtienen 0,85 L del vinote H1 liberado del etanol. Se prepara la solución de sustrato, de un volumen de 1,5 L, utilizada para la producción de enzima, a partir de este vinote con adición de xilosa para obtener una concentración final de sustrato carbonado de 200 g.L⁻¹. Se realiza la fermentación en las mismas condiciones que para los Ejemplos 1 a 3. Se detiene la fermentación a las 136 horas.

25 Las determinaciones analíticas sobre el mosto final dan los resultados indicados en la tabla siguiente. Se precipitan las proteínas con ácido tricloroacético con el fin de evitar la reacción coloreada no deseada ligada a las impurezas del residuo.

Substrato consumido g.L ⁻¹	59,0
Biomasa g.L ⁻¹	12,0
Proteínas mg.mL ⁻¹	33,6
UPF U.ml ⁻¹	10,5
Celobiasas U.mL ⁻¹	4,5

30 **Ejemplo 5: Producción de enzimas sobre xilosa utilizando el residuo producido por fermentación etanólica de un hidrolizado impulsado de un material celulósico tratado y del que se han eliminado las pentosas como fuente inductora**

35 Como en el Ejemplo 4, se realiza la producción de biomasa en "batch" con 20 g.L⁻¹ de xilosa. Se realiza la producción de enzimas en "fed batch" con una solución de sustrato preparada a partir de vinotes a los que se añade xilosa. En el caso presente, se prepara la solución de vinotes, referenciada como H2, de la misma forma que para H1, pero se prolonga la hidrólisis hasta 48 horas con una adición de enzimas, idéntica a la primera adición, tras 24 horas de hidrólisis. El hidrolizado contiene 110,8 g.L⁻¹ de glucosa y 11,8 g.L⁻¹ de xilosa. Se utiliza el vinote H2, tras eliminación del etanol y concentración, para preparar 1,5 L de una solución de sustrato de 200 g.L⁻¹ en azúcares totales. Se realiza la fermentación en las mismas condiciones que para el Ejemplo 4; se detiene la fermentación a las 158 horas.

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

Substrato consumido g.L ⁻¹	62,5
Biomasa g.L ⁻¹	14,5
Proteínas mg.mL ⁻¹	28,0
UPF U.ml ⁻¹	10,0
Celobiasas U.mL ⁻¹	4,7

45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de etanol a partir de materiales celulósicos o lignocelulósicos que comprende las etapas siguientes:

- 5
- 1) el pretratamiento químico y/o físico de un sustrato celulósico o lignocelulósico;
 - 2) la hidrólisis enzimática del sustrato pretratado utilizando enzimas celulolíticas producidas por los hongos pertenecientes a la especie *Trichoderma reesei*;
 - 3) la fermentación etanólica por un microorganismo alcoholígeno apropiado del hidrolizado procedente de la etapa (2) y la obtención de un mosto de fermentación; y
 - 4) la separación del microorganismo alcoholígeno utilizado en la etapa (3), la separación/purificación del etanol y la obtención de una fase acuosa que constituye un residuo,
- 10

15 donde se utiliza el residuo constituido por los vinotes de destilación, tras la separación del etanol, como fuente de carbono inductora o total para la producción de dichas enzimas celulolíticas .

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho residuo es utilizado como fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo celulolítico y la producción de enzimas celulolíticas.

20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, donde el residuo es utilizado como fuente de carbono inductora complementaria de otras fuentes de carbono utilizadas para el crecimiento del microorganismo celulolítico.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, donde el residuo es utilizado como única fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo celulolítico y la producción de enzimas celulolíticas.

25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, donde los materiales celulósicos o lignocelulósicos son seleccionados entre las pajas, la madera, los cultivos forestales, los residuos alcoholígenos de plantas, azucareros y de cereales, los residuos de la industria papelera y los productos de transformación de los materiales celulósicos y lignocelulósicos.

30

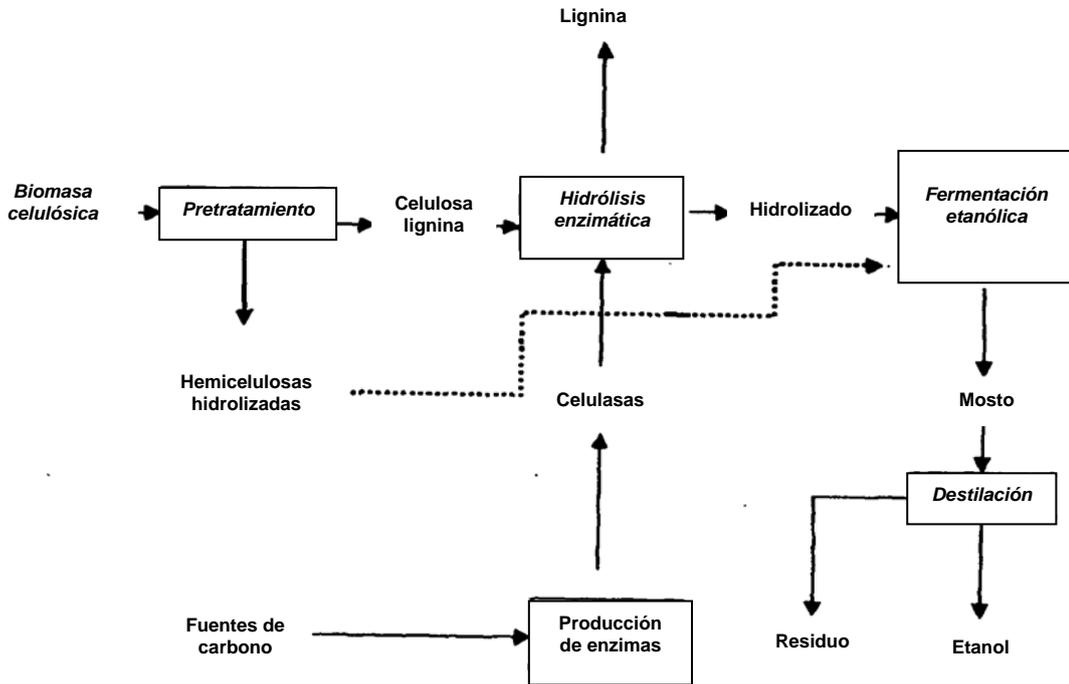


FIG. 1

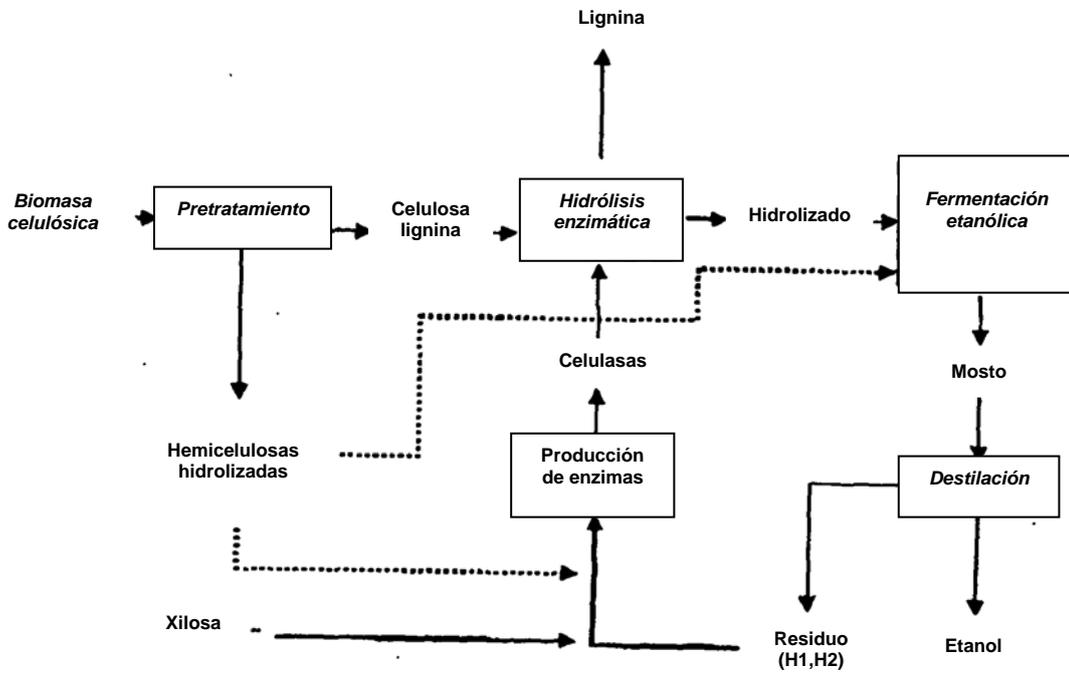


FIG. 2